DANIEL MAY DE OLIVEIRA

**EFEITO DO ÁCIDO GRAXO DE CADEIA CURTA,
ACETATO, NAS CÉLULAS DA MICROGLIA ATIVADAS POR
LIPOPOLISSACÁRIDE (LPS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo
2015

DANIEL MAY DE OLIVEIRA

**EFEITO DO ÁCIDO GRAXO DE CADEIA CURTA,
ACETATO, NAS CÉLULAS DA MICROGLIA ATIVADAS POR
LIPOPOLISSACÁRIDE (LPS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Co-orientador: Jean Pierre Schatzmann Peron

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de teses e dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Oliveira, Daniel May de.

Efeito do ácido graxo de cadeia curta, acetato, nas células da microglia ativadas por lipopolissacáride (LPS) / Daniel May de Oliveira.
-- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Neuroimunologia.

Versão do título para o inglês: Effect of the short chain fatty acid , acetate, on microglial cells activated by lipopolysaccharide (LPS).

1. Acetato 2. Ácido graxo de cadeia curta 3. Microglia 4. Lipopolissacaride 5. Inflamação 6. Autofagia I. Câmara, Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0100/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniel May de Oliveira.

Título da Tese: Efeito do ácido graxo de cadeia curta, acetato, nas células da microglia ativadas por lipopolissacáride (LPS).

Orientador(a): Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: icb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **034** nas fls. **100** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Niels Olsen Saraiva Câmara**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Teto da leptina na ativação das células da Cilia: Importância na imunidade no sistema nervoso Central*" do qual participam o(s) alunos **Jean Pierre S Peron, Daniel May de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **06.04.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 11 de abril de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

**Este trabalho é dedicado à minha esposa Larissa.
Por uma ironia da vida, este trabalho é dedicado também às duas pessoas
que mais dificultaram a sua realização e que quase me fizeram desistir de
tudo, aos meus filhos Gabriel e Júlia.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, o professor Niels pela paciência que teve comigo nas inúmeras ocasiões em que os experimentos não funcionaram.

Ao meu co-orientador, o Jean, que sempre esteve pronto a discutir os experimentos e a colocar seus alunos à disposição para me ajudar nos experimentos mais longos e cansativos.

Ao meu amigo Felipe Valença que sempre esteve pronto a discutir resultados e técnicas e a me ajudar nos experimentos.

À Mariane Amano que sempre teve paciência para me ensinar tanto técnicas de laboratório quanto os trâmites burocráticos da USP.

Aos meus amigos, Wesley, Cristiano e Juliana que tanto me ajudaram nos experimentos com animais e culturas.

Aos meus amigos e colagas de laboratório, Vinicius, Iris, Angela, Marina, Tarcio, Matheus, Lislaine, Marcela, Marceli, Fernanda, Wellinton, Rafael, Camila, Flávia e Cris.

Ao professor Fernando Sá que me ensinou a técnica de MTT.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp 2012/02207-0).

Para examinar a verdade, é necessário, uma vez na vida, colocar todas as coisas em dúvida o máximo possível (René Descartes).

RESUMO

Oliveira DM. Efeito do ácido graxo de cadeia curta, acetato, nas células da microglia ativadas por lipopolissacáride (LPS) [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são compostos que contêm de 1 a 6 átomos de carbono, sendo butirato e propionato os mais estudados. Estudos mostraram que possuem efeitos imunomoduladores, antiproliferativos e pró-apoptóticos, via ativação de receptores acoplados à proteína G (GPR 41 e 43) ou via controle epigenético, agindo na histona acetil transferase (HAT) e na histona deacetilase (HDAC). O acetato é o AGCC encontrado em maiores concentrações nos cólons e no sangue, sendo também um intermediário em diversas reações metabólicas. Apesar disso, foi pouco estudado até o momento. As células da microglia são os macrófagos residentes no sistema nervoso central e desempenham importante papel em diversas doenças. **Hipótese:** Apesar dos seus efeitos pró-apoptóticos, o acetato induz citoproteção secundária aos seus efeitos imunomoduladores. **Objetivo:** estudar os efeitos do acetato na microglia esclarecendo seus efeitos na produção de mediadores inflamatórios e na viabilidade celular. **Método:** Foram utilizadas culturas primárias de microglia de camundongo e culturas de linhagem imortalizada de microglia (C8-B4). A microglia foi ativada com lipopolissacáride (LPS). A toxina pertussis (PTX) e a tricostatina A, um inibidor de HDAC, foram usados, respectivamente, para bloquear os receptores GPR e mimetizar efeitos epigenéticos. Os parâmetros avaliados foram a produção de mediadores inflamatórios e a viabilidade celular. **Resultados:** O tratamento com acetato (25 mM) mostrou efeitos citoprotetores em culturas de microglia estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. O tratamento alterou ainda a produção de citocinas pela linhagem de microglia com redução da produção de IL-6 e aumento da produção de TNF- α . O tratamento de culturas primárias com diferentes doses de acetato mostrou resultados semelhantes, confirmando o aumento da produção de TNF- α . O bloqueio da ação de receptores GPR pela PTX não reverteu os efeitos do acetato. A tricostatina mimetizou os efeitos do acetato, induzindo tanto citoproteção quanto aumento de TNF- α . O uso simultâneo de acetato e tricostatina não mostrou somatória de efeitos. O acetato não alterou a atividade de HDAC, mas houve aumento da atividade de HAT nas culturas tratadas com LPS. A expressão da proteína p62 foi avaliada com 12, 24 e 48 horas de tratamento. O acetato reduziu a expressão nos três tempos. A quantificação dos lisossomos após 24 horas de tratamento mostrou aumento do número de lisossomos nos grupos tratados com acetato em relação aos demais ($p < 0,001$). O bloqueio da autofagia com cloroquina reverteu os efeitos citoprotetores do acetato após 48 horas de tratamento. **Conclusão:** O acetato estimula a produção de TNF- α e melhora a viabilidade de culturas da microglia ativadas por LPS. A melhora da viabilidade celular ocorre pela indução de autofagia. O mecanismo responsável pela indução da autofagia é epigenético, sendo completamente independente da ativação de receptores GPR.

Palavras-chave: Acetato. Ácido graxo de cadeia curta. Microglia. Lipopolissacáride. Inflamação. Viabilidade celular. Autofagia.

ABSTRACT

Oliveira DM. Effect of the short chain fatty acid, acetate, on microglial cells activated by lipopolysaccharide (LPS) [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Introduction: short-chain fatty acids (SCFA) are compounds containing from 1 to 6 carbon atoms, propionate and butyrate being the most studied. Studies have shown that these compounds have immunomodulatory, anti-proliferative and pro-apoptotic effects via activation of G-protein coupled receptors (GPR 41 and 43) or via epigenetic control acting on histone acetyl transferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC). Acetate is the SCFA found in highest concentrations in the colon and blood. It is also an intermediate in many metabolic reactions. Nevertheless, it was little studied so far. The microglial cells are resident macrophages of the central nervous system and play an important role in several diseases. **Hypothesis:** Despite its pro-apoptotic effects, acetate induces cytoprotection which is secondary to immunomodulatory effects. **Objective:** To study the effects of acetate on microglia and clarify its effects on inflammatory mediators' production and cell viability. **Method:** Primary mouse microglial cultures and immortalized lineage (C8-B4) were used. The microglia was activated with lipopolysaccharide (LPS). Pertussis toxin (PTX) and trichostatin A, an inhibitor of HDAC, were used, respectively, to block GPR receptors and mimic epigenetic effects. We evaluated the production of inflammatory mediators and cell viability. **Results:** Treatment with acetate (25 mM) showed cytoprotective effects in microglial cultures stimulated with LPS 0.25µg/ml. The treatment also altered production of cytokines by the microglial strain with decreased IL-6 production and increased TNF-α production. The treatment of primary cultures with different doses of acetate showed similar results confirming increased TNF-α production. The blockade of GRP receptors with PTX did not reverse the effects of acetate. Trichostatin mimicked the effects of the acetate inducing cytoprotection and increasing TNF-α production. Simultaneous use of acetate and trichostatin showed no sum of effects. Acetate did not affect HDAC activity, but there was an increase in HAT activity in cultures treated with LPS. Expression of p62 protein was analyzed 12, 24 and 48 hours of treatment. Acetate reduced its expression at all times tested. The quantification of lysosomes after 24 hours of treatment showed increased number of lysosomes in groups treated with acetate compared to the others (p <0.001). The blocking of autophagy with chloroquine reversed cytoprotective effects acetate after 48 hours of treatment. **Conclusion:** Acetate stimulates TNF-α production and improves cell viability of microglial cultures activated by LPS. The improved cell viability occurs by autophagy induction. The mechanism responsible for induction of autophagy is epigenetic, being completely independent of the GRP receptor activation.

Keywords: Acetate. Short Chain Fatty Acid. Microglia. Lipopolysaccharide. Inflammation.

Cell viability. Autophagy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de óxido nítrico por células da microglia em resposta à ativação por diferentes doses de LPS ou IFN- γ	61
Figura 2 - Evolução de microglia C8-B4 em cultura.....	62
Figura 3 - Efeito do acetato na proliferação de células da Microglia.....	63
Figura 4 - Efeito do acetato na proliferação de células da Microglia	64
Figura 5 - Expressão gênica de receptores de AGCC em culturas de microglia.....	66
Figura 6 - Efeito do acetato na viabilidade celular.....	68
Figura 7 - Efeito do acetato no ciclo celular de células da microglia.....	69
Figura 8 - Efeito do acetato na apoptose induzida por LPS em células da microglia.....	74
Figura 9 - Efeito do acetato na viabilidade celular, efeito do bloqueio da proteína G inibitória pela toxina pertussis.....	76
Figura 10 - Efeito do acetato na viabilidade celular, efeito do bloqueio da proteína G inibitória pela toxina pertussis.....	77
Figura 11 - Produção de óxido nítrico, superóxido e espécies reativas de oxigênio em culturas de microglia.....	78
Figura 12 - Efeito do acetato na produção de citocinas por células da microglia.....	80
Figura 13 - Expressão gênica de TNF- α e IL-16 em culturas de microglia.....	81
Figura 14 - Efeito do acetato na produção TNF- α por células da microglia.....	82
Figura 15 - Efeito do acetato na produção de TNF- α por culturas primárias de microglia de camundongo.....	83
Figura 16 - Secreção de Glutamato por culturas de microglia tratadas com LPS e acetato.....	85
Figura 17 - Viabilidade celular por Azul de tripan.....	87
Figura 18 - Viabilidade de microglias C8-B4 tratadas com tricostatina e LPS.....	88
Figura 19 - Efeito da tricostatina na produção TNF- α por células da microglia.....	89
Figura 20 - Efeito do tratamento simultâneo com acetato e tricostatina em culturas de microglia estimuladas com LPS.....	90
Figura 21 - Atividade de HDAC e HAT em culturas de microglia tratadas com LPS e acetato.....	91
Figura 22 - Efeito do acetato na expressão da proteína p62 por células da microglia.....	93

Figura 23 - Quantificação de lisossomos em células da microglia tratadas com acetato e estimuladas com LPS.....	97
Figura 24 - Bloqueio da ação do acetato pela cloroquina.....	98
Figura 25 - Efeito do acetato na expressão de genes relacionados a autofagia.....	99
Figura 26 - Ensaio MitoSOX. Efeito do acetato na produção de superóxido.....	100
Figura 27 - Efeito do acetato na biogênese mitocondrial.....	102

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA.....	16
1.2	RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G.....	18
1.3	AGCC E CONTROLE EPIGENÉTICO.....	21
1.4	INFLUÊNCIA DOS AGCC NO SISTEMA IMUNE.....	23
1.5	MICROGLIA.....	28
1.6	AUTOFAGIA E IMUNIDADE DO SNC.....	33
1.7	RELAÇÃO ENTRE AGCC E AUTOFAGIA.....	37
2	HIPÓTESE.....	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	GERAL.....	40
3.2	ESPECÍFICOS.....	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	ANIMAIS.....	41
4.2	REAGENTES.....	41
4.3	CULTURA MISTA DE CÉLULAS DA GLIA.....	42
4.4	CULTURA DE LINHAGENS CELULARES.....	43
4.5	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA.....	44
4.6	QUANTIFICAÇÃO DO RNA.....	45
4.7	SÍNTESE DE cDNA.....	45
4.8	EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS GÊNICOS - PCR QUANTITATIVO.....	46
4.9	DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA.....	48
4.10	CITOMETRIA DE FLUXO.....	48
4.11	ENSAIO DE 7AAD + ANEXINA V.....	49
4.12	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT.....	50
4.13	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR POR CSFE.....	51
4.14	TESTE DE GRIESS.....	51

4.15 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) INTRACELULAR POR DAF-FM.....	52
4.16 ENSAIO CBA.....	53
4.17 ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LISOSSOMOS.....	53
4.18 ENSAIO COLORIMÉTRICO PARA DOSAGEM DE GLUTAMATO.....	54
4.19 ENSAIO MITOSOX.....	55
4.20 ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE HDAC.....	56
4.21 ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE HAT.....	57
4.22 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE CICLO CELULAR.....	58
4.23 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR AZUL DE TRIPAM.....	58
4.24 WESTERN BLOTTING.....	58
4.25 ENSAIO COLORIMÉTRICO PARA DOSAGEM DE LDH EM MEIO DE CULTURA.....	60
4.26 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5 RESULTADOS.....	61
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM C8-B4.....	61
5.2 RESPOSTA DA MICROGLIA C8-B4 A DIFERENTES DOSES DE ACETATO.....	62
5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE AGCC.....	65
5.4 EFEITO DO ACETATO NA VIABILIDADE CELULAR.....	66
5.5 EFEITO DO BLOQUEIO DO BLOQUEIO DA PROTEÍNA GαI NA VIABILIDADE CELULAR DA MICROGLIA.....	70
5.6 EFEITO DO ACETATO NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO.....	77
5.7 EFEITO DO ACETATO NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS.....	78
5.8 EFEITO DO ACETATO NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO.....	83
5.9 EPIGENÉTICA COMO MECANISMO DE AÇÃO DO ACETATO.....	85
5.10 ACETATO INDUZ AUTOFAGIA POR VIA EPIGENÉTICA.....	91
5.11 ACETATO NÃO INTERFERE NA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL.....	99
6 DISCUSSÃO.....	103
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
8 CONCLUSÕES.....	132

REFERÊNCIAS.....	133
-------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA

Fermentação é definida como conjunto de reações metabólicas de caráter anaeróbico que tem como resultado final a produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP). Ela se diferencia da cadeia respiratória por usar um composto orgânico como aceptor final de hidrogênios. Na cadeia respiratória, que caracteriza a respiração celular, o oxigênio desempenha esse papel. A relevância do processo de fermentação reside no fato de ser uma fonte de energia em situações onde a produção de ATP não pode ser mantida pelo processo de fosforilação oxidativa (1).

Bactérias anaeróbicas são sensíveis à presença de oxigênio, sendo restritas, portanto, a ambientes com mínima concentração de oxigênio. Existem, no entanto, bactérias anaeróbicas facultativas capazes de usar a fermentação em condições anaeróbicas e a respiração em condições aeróbicas. Existem ainda micro-organismos que realizam fermentação mesmo na presença de grandes concentrações de oxigênio como as leveduras (1).

Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são compostos orgânicos que possuem de 1 a 5 átomos de carbono, por exemplo: formato (C1), acetato (C2), proprionato (C3), butirato (C4) e valerato (C5)(2). São produzidos em grandes

quantidades nos intestinos como resultado da fermentação de compostos alimentares pela microbiota (3-6). Entre os principais alimentos responsáveis por sua produção destacam-se as fibras alimentares e os carboidratos complexos não digeríveis presentes nos chamados amidos resistentes (do inglês: *resistant starches*) que são compostos resistentes à ação de enzimas digestivas e à absorção no intestino delgado (7, 8). Além desses, formas modificadas de celulose, alguns açúcares não absorvíveis e proteínas também representam compostos que sofrem fermentação nos cólons e contribuem em menor parte para produção de AGCC nos cólons (2, 9).

Além da presença de substrato adequado, outros fatores também influenciam na produção e absorção de AGCC como tempo de trânsito intestinal (10-12), quantidade e tipo da microbiota (10). Alguns autores destacam filos bacterianos responsáveis pela fermentação de fibras, outros preferem classificar as bactérias produtoras de AGCC como um grupo funcionalmente distinto evitando diferenciação filogenética (13). Nesse contexto, algumas espécies bacterianas como *bifidobacterium* e *lactobacillus* foram associadas com melhor saúde o que levou à ideia do uso de probióticos como forma de prevenir ou tratar doenças. O mecanismo subjacente à ação dessas substâncias pode ser a produção de AGCC (10).

Acetato, proprionato e butirato são os AGCC mais estudados. Destes o butirato é o mais estudado por seus potentes efeitos anti-inflamatórios (14). Todavia, o acetato é produzido em maior quantidade numa relação de concentrações molares da ordem de 60:20:20 respectivamente (4, 6). Por ser

rapidamente transportado ao fígado, é menos utilizado pelas células colônicas (11) o que contribui para que seja encontrado em maiores concentrações séricas (6).

A relevância clínica da presença de fibras na dieta foi demonstrada em estudo piloto onde pacientes com retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) receberam 60 g de aveia por dia por três meses. Em comparação ao grupo controle, esses pacientes apresentaram menos dor abdominal e melhor evolução clínica (15). Alguns estudos mostraram melhora de parâmetros histológicos com uso de enemas com butirato (16, 17), no entanto nem sempre o resultado foi melhor que o do controle (18). Em comum, esses estudos tiveram tempo de acompanhamento de não mais que 12 semanas, não permitindo, portanto, conclusões sobre o efeito de longo prazo dos AGCC nesse tipo de doença.

1.2 RECEPTORES DE AGCC ACOPLADOS À PROTEÍNA G

Em 2003, os receptores acoplados a proteína G (GPR) 41 e 43 foram identificados como receptores dos AGCC. O GPR41 é expresso por uma ampla gama de tecidos, sendo o tecido adiposo o de maior expressão seguido por baço, pâncreas e placenta. Enquanto ossos, cartilagens e macrófagos apresentam as mais baixas taxas de expressão. Em geral, esse receptor apresenta baixa expressão tecidual. O GPR43 tem alta expressão gênica em amostras de baço, adenoides, miométrio e mamas. Quando avaliada em células purificadas, neutrófilos e monócitos apresentam expressão elevada, seguidos por mononucleares de sangue periférico e linfócitos B (19). Logo, o GPR43 parece estar mais associado ao

sistema imune enquanto o GPR41 parece estar mais associado ao metabolismo. Ambos funcionam a partir da ativação da proteína G inibitória (20).

Em relação à potência de ativação, para o GPR41 o propionato é o composto de maior atividade agonista seguido por butirato e depois, acetato, sendo esse último 100 vezes menos potente que o propionato. Para o GPR43 também o propionato tem a maior atividade agonista seguido por acetato e butirato que possuem potência semelhante (20).

A relevância do GPR43 na resposta imune foi evidenciada por diversos estudos. Animais GPR43^{-/-} apresentam resposta imune exacerbada em modelos de artrite, colite e asma com maior produção de mediadores inflamatórios por células do sistema imune. Efeito semelhante é observado em animais livres de bactérias (“germ-free”) e é revertido pela reposição de acetato (21).

É interessante ressaltar que embora o GPR43 tenha sido relacionado ao sistema imune, também pode ter efeitos sobre o metabolismo. Foi demonstrado que a ativação deste receptor em adipócitos induz inibição da lipólise e redução dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres (22). Outro elo entre GPR43 e metabolismo foi sugerido por estudo que demonstrou que a ativação desse receptor em adipócitos estimula a produção de leptina (23).

A maior expressão do GPR41 em tecido adiposo sinaliza que esse receptor é mais relevante para o metabolismo que para o sistema imune. De fato, um estudo mostrou que diferentes AGCC são capazes de estimular a produção de leptina por adipócitos. É interessante ressaltar que as concentrações utilizadas nesse estudo estavam dentro dos padrões fisiológicos o que aumenta a importância do achado (24).

A leptina é hormônio responsável pela sensação de saciedade (25). Pode-se imaginar, portanto, uma relação entre AGCC e obesidade. Essa suposição é corroborada pelo fato de que camundongos machos GPR41-/- apresentam aumento da gordura corporal (26). Embora esses achados façam crer que o GPR41 está ligado ao metabolismo, não se deve perder de vista que a leptina e o tecido adiposo possuem estreitas relações com o sistema imune (27-31), logo não se pode descartar que esse receptor tenha papel relevante na resposta imune.

Recentemente, foi identificado um terceiro receptor responsivo aos AGCC. O receptor olfatório 78 (Olf78) é expresso nos rins, nos ramos principais da artéria renal e nas células da junção justaglomerular responsáveis pela secreção de renina. Ao contrário dos outros receptores dos AGCC, o receptor Olf78 mostrou-se responsivo apenas ao acetato e ao propionato respondendo a ativação com liberação de renina e efeito pró-hipertensivo. No entanto o estudo mostrou que prevalece o efeito hipotensivo dos AGCC no rim que é mediado pelo receptor GPR41 (32). Tanto a expressão quanto as possíveis funções do receptor Olf78 em outros tecidos foram pouco estudadas até o momento, porém já foi demonstrada sua expressão em nervos autonômicos e músculo liso (33, 34). Não se sabe ao certo qual tipo de proteína G é ativada pelo Olf78, porém, tendo em vista que sua ativação renal se contrapõe aos efeitos da ativação do GPR41, especula-se que ative a proteína Gs (32).

A descoberta da ativação do Olf78 por AGCC mostra que a importância desses compostos na fisiologia humana é ainda campo aberto a inúmeras descobertas, pois, possivelmente, esse receptor deve ser expresso em vários outros tecidos onde deve desempenhar funções outras não necessariamente relacionadas

ao controle pressórico. Além disso, é provável que outros receptores para os AGCC ainda venham a ser identificados.

1.3 AGCC E CONTROLE EPIGENÉTICO

Epigenética pode ser definida como “o conjunto de adaptações estruturais de regiões cromossômicas que permite registrar, sinalizar ou perpetuar estados alterados de atividade”(35). As “adaptações estruturais” podem ocorrer por modificações no próprio DNA, por exemplo: metilação de DNA e RNAs de interferência, alterações pós-translacionais nas histonas ou substituição de histonas por variantes especializadas e ainda por remodelamento de histonas dependente de ATP que altera as relações de contato entre histonas e DNA (36). O resultado final dessas alterações determina a intensidade da compactação da cromatina definido como aberto (eucromatina) ou fechado (heterocromatina) (37).

Entre as várias alterações epigenéticas em histonas destaca-se a acetilação. Nesse processo a adição de grupos acetil negativamente carregados a resíduos de lisina na porção N-terminal das histonas ajuda a neutralizar a carga positiva desses aminoácidos reduzindo a atração eletrostática DNA-histona e facilitando o acesso dos fatores de transcrição. Logo, quanto maior a acetilação, maior a capacidade de aumento da transcrição gênica em um segmento de DNA (38).

Dois tipos de enzimas respondem pelo grau de acetilação de DNA, as acetiltransferases de histonas (HAT, do inglês: *histone acetyl transferases*) que catalisam a transferência de grupos acetil aos resíduos de lisina, e as histona

deacetilases (HDAC) que catalisam a remoção desses grupos (39). Nos mamíferos existem 4 grupos de HDACs: classes I, II e IV (zinco dependentes) e classe III, ATP dependentes e também conhecidas como sirtuínas (40). As HDAC das classes I, II e IV são ainda subdivididas em: Classe I, HDAC 1, 2,3 e 8; classe II, HDAC 4, 5, 6, 7 e 9 e classe IV, HDAC 11 (41). As HAT também são divididas em diferentes famílias e se distribuem tanto no núcleo quanto no citoplasma. Suas principais famílias são: p300/CBP, MYST, GNAT e NCOA (42). Essas famílias são subdivididas em vários membros, por exemplo: GCN5 e PCAF são dois membros da família GNAT encontrados em humanos, Tip60 é um dos vários membros da família MYST encontrados em humanos (42, 43).

Foi demonstrado que os AGCC têm a capacidade de inibir a atividade das HDACs. Desde 1979, sabe-se que o butirato é inibidor não competitivo da HDAC de classe I (44). Em relação ao acetato, um estudo mostrou que o tratamento com dose única não alterou o padrão de acetilação em amostras de fígado, porém foi eficiente em inibir a atividade de HDAC em amostras de cérebro extraídas entre 2 e 4 horas após o tratamento. Foi detectada ainda redução da expressão da HDAC 2 que ocorreu 4 horas após o tratamento. Os autores avaliaram a expressão de outras HDACs (1, 2, 3, 4, 5 e 7), nenhuma dessas mostrou alteração na expressão (45). Outro estudo avaliou o efeito do tratamento crônico em modelo de neuroinflamação induzida por LPS. O acetato foi administrado durante os 28 dias anteriores aos experimentos. Houve aumento da acetilação de histonas com aumento da atividade de HATs. O efeito em HDACs foi variável com redução ou aumento da expressão dependendo da enzima avaliada. Ocorreu ainda redução da expressão de IL-1 β sugerindo que o tratamento resultou em redução da

neuroinflamação (46). Estudo que avaliou o efeito do acetato em modelo de neuroborreliose em ratos encontrou efeitos semelhantes com redução da ativação de microglia e da expressão cerebral de IL-1 β (47). O acetato foi também testado em culturas de microglia estimuladas com LPS (6,25 ng/ml por 4 horas). O tratamento reverteu a hipoacetilação de histona (H3K9) induzida pelo LPS e reduziu a expressão proteica de IL-6, IL-1 β e TNF- α (48). Resultados semelhantes foram encontrados quando o mesmo esquema de tratamento com LPS e a mesma dose de acetato (12 mM) foram usados em astrócitos (49).

O conjunto de dados da literatura disponível até o momento sugere que o acetato acentua a acetilação de DNA no SNC através de diferentes mecanismos que variam de acordo com a dose e o tempo de tratamento. O resultado dessa maior acetilação se manifesta na forma de atenuação de parâmetros inflamatórios como expressão de citocinas pró-inflamatórias da imunidade inata. Pode-se especular que o efeito final dessa cadeia de eventos *in vivo* seja a preservação de neurônios e uma melhor evolução clínica em situações de neuroinflamação.

1.4 INFLUÊNCIA DOS AGCC NO SISTEMA IMUNE

Os efeitos dos AGCC no sistema imune foram evidenciados em diversos estudos. O butirato inibe a produção de IL-12 e acentua a expressão de IL-10 em monócitos humanos derivados de mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimulados com estafilococos aureus. O mesmo estudo mostrou ainda redução da

expressão de IL-12R em PBMC estimuladas com anti-CD3 com consequente redução da produção de INF- γ e inibição da resposta Th1 (50). Em outro estudo, o tratamento com butirato levou à redução da translocação do NF-kB para o núcleo e redução da expressão de IL-6, IL-1 β e TNF- α (14). Na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 butirato e acetato inibem a expressão de iNOS, TNF- α e IL-6 induzidas por INF- γ e aumentam a expressão de IL-10 (51).

Nem todos os estudos mostram efeitos anti-inflamatórios relacionados aos AGCC. Linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos de rato estimulados com concavalina A reduzem a produção de INF- γ quando estimulados com butirato e aumentam quando tratados com acetato ou propionato. Por outro lado, acetato e propionato aumentam a produção de IL-10 que não é influenciada pelo butirato, os três compostos combinados levaram ao desenvolvimento de linfócitos com perfil menos inflamatório (52).

O efeito dos AGCC na quimiotaxia pode variar consideravelmente de acordo com o tipo de estímulo quimiotático, dose, ou tipo celular empregado, por exemplo: um estudo utilizou duas linhagens diferentes de células humanas intestinais estimuladas com IL-1 β , Caco-2 e HT-29. A mesma dose de butirato (5 mM) reduziu a migração de neutrófilos em relação à linhagem Caco-2 e aumentou em relação à HT-29. O resultado contraditório foi explicado pela produção de IL-8, reduzida na linhagem Caco-2 e aumentada na HT-29 (53).

Em relação ao estímulo quimiotático, um estudo avaliou a migração de neutrófilos induzida por ensaio de bolsa de ar em tecido subcutâneo. O tratamento

com AGCC foi efetivo em aumentar a migração de neutrófilos. Dos AGCC testados, o acetato mostrou o efeito menos proeminente. Quando o peptídeo bacteriano formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) foi utilizado, nenhuma diferença foi observada (54) mostrando que o efeito dos AGCC na quimiotaxia de neutrófilos é dependente do estímulo empregado.

Em células mononucleares os resultados são menos contraditórios. O butirato inibe a migração de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) e macrófagos primários de ratos estimulados com LPS (55). Acetato, butirato e propionato inibem a produção, tanto constitutiva quanto estimulada por LPS, de MCP-1 em monócitos humanos (56).

Em princípio, o efeito quimiotático dos AGCC é mediado pela ativação do receptor GPR43. Em modelo de colite crônica induzida por dextran, animais GPR43^{-/-} mostraram redução da quimioatração de polimorfonucleares e redução da lesão tecidual inflamatória, porém não houve diferenças quando o modelo empregado era completamente estéril mostrando a importância da microbiota para ativação do receptor. O estudo também mostrou redução da adesão e da expressão de L-selectina após tratamento com propionato e butirato (57).

Em cultura primária de microglia de rato, o butirato reduziu a produção de IL-6 e TNF- α e óxido nítrico (NO) quando foi administrado 22 horas antes do estímulo com LPS, mas reduziu apenas a produção de IL-6 e elevou a liberação de NO quando foi administrado simultaneamente ao LPS (58). Em outro estudo, o butirato foi efetivo em reduzir a produção de NO e a expressão de iNOS induzida

por INF- γ , mas não por LPS (59). As diferenças entre os regimes de tratamento impedem uma comparação direta entre esses dois estudos.

Em células de adenocarcinoma humano da linhagem HT-29, células humanas de lâmina própria, PBMC e em ratos com colite induzida por trinitrobenzeno, o efeito anti-inflamatório do butirato ocorre pela inibição da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) (60) provavelmente em decorrência da inibição da HDAC (61). A atividade do NF- κ B está alterada em doenças inflamatórias intestinais como, por exemplo: Doença de Crohn e RCUI (62, 63), porém a importância desse achado vai além da inflamação propriamente dita uma vez que a atividade dessa molécula também está frequentemente alterada no câncer de cólon (64).

Os AGCC também apresentam efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos. O butirato inibe a proliferação celular com efeitos que diferem de acordo com o tipo de célula testada. O efeito pró-apoptótico por sua vez parece estar associado ao efeito antiproliferativo. Também parece haver associação entre o grau de diferenciação e a eficácia do butirato, células de adenocarcinoma colônico HT-29 tratadas com butirato reduzem sua taxa de proliferação e aumentam sua taxa de apoptose e o seu grau de diferenciação enquanto células normais de epitélio de cólon não são afetadas (65).

O butirato induz apoptose em células de câncer colorretal HCT116 via ativação de p38, indução de estresse de retículo e ativação de caspases 3 e 7 (66). Efeito semelhante foi demonstrado em células de adenocarcinoma colorretal HT-29.

É interessante comentar que a exposição prologanda dessas células a doses gradualmente aumentadas de butirato produziu células resistentes ao efeito pró-apoptótico. Comparação entre células com e sem exposição prolongada ao butirato revelou que a resistência ao efeito pró-apoptótico ocorreu após aumento da capacidade de expressão de proteínas antiapoptóticas e ligadas ao ciclo celular (67). O butirato também apresenta efeitos antiproliferativos em diferentes células do sistema imune como: linfócitos T, macrófagos derivados de medula óssea, e células RAW 264.7. O efeito pró-apoptótico, no entanto, foi observado apenas em linfócitos T ativados e na linhagem imortalizada de macrófagos (68). O mesmo estudo sugeriu que as ações pró-apoptóticas e imunomodulatórias do butirato são mais proeminentes em células que estão ativamente proliferando e menos expressivos em células mais diferenciadas e em repouso (68).

O acetato também foi associado a efeito pró-apoptótico. Em estudo com animais GPR43^{-/-} a dose de 10 mM induziu apoptose de forma GPR43 dependente em neutrófilos, porém a dose de 30 mM foi efetiva em induzir apoptose de neutrófilos mesmo em animais deficientes de GPR43 embora o resultado fosse menos proeminente. Isso sugere que o acetato é capaz de induzir apoptose de neutrófilos através de diferentes mecanismos dependendo da dose utilizada (21). Em neutrófilos humanos, a dose de 4 mM de acetato não induziu apoptose espontânea, nem exacerbou apoptose induzida por LPS ou TNF- α . A mesma dose de butirato e propionato foi efetiva nas três situações, o bloqueio da sinalização dos receptores GPR41 e 43 com toxina pertussis não reverteu o resultado enquanto que a tricostatina A, um inibidor de HDACs de classe I e II, conseguiu

mimetizar os resultados obtidos com butirato e propionato (69). Esses dois estudos evidenciam que os AGCC podem estimular morte celular programada por diferentes mecanismos que podem depender das doses utilizadas.

Uma crítica associada aos experimentos que mostram efeitos pró-apoptóticos dos AGCC é de que as doses utilizadas *in vitro* estão quase sempre muito acima das concentrações aferidas na corrente sanguínea. Os resultados obtidos nesses estudos poderiam refletir um efeito tóxico dessas altas concentrações que poderia em muito diferir das ações fisiológicas desses compostos. Deve-se considerar, no entanto, que as concentrações séricas desses compostos podem apresentar grandes variações relacionadas à dieta, consumo de álcool ou doenças metabólicas (70-72). Além disso, as concentrações encontradas nos cólons por vezes até superam às utilizadas em estudos com linhagens derivadas de células dos cólons o que corrobora especulações de que os AGCC poderiam responder pelos efeitos anticancerígenos associados às dietas ricas em fibras. Por fim deve-se considerar a possibilidade de uso farmacêutico desses compostos com doses mais elevadas para obter resultados mais significativos.

1.5 MICROGLIA

Classicamente descritas como macrófagos residentes do SNC, as células da microglia surgem inicialmente da vesícula vitelina e depois de precursores mielóides que migram para o SNC durante o período embrionário. No SNC,

rapidamente se espalham por cérebro e medula espinhal formando uma população que se autorrenova por toda a vida (73). No entanto, quando o SNC é acometido por processos inflamatórios, ocorre recrutamento de células imunes da corrente sanguínea o que leva a formação de infiltrados formados tanto por microglia quanto por monócitos/macrófagos que, quando estabelecidos, são difíceis de distinguir da microglia residente porque apresentam o mesmo padrão de expressão de marcadores celulares (74).

Tal como outros fagócitos mononucleares, a microglia tem a capacidade de expressar diversas citocinas, quimiocinas, moléculas coestimulatórias e TLRs entre outros (74). Entretanto, quando inativada, a microglia difere de outros macrófagos por apresentar menor expressão de moléculas pró-inflamatórias sendo a principal diferença sua baixa expressão de moléculas de MHC de classe II em relação a macrófagos infiltrantes (75). A necessidade de manutenção de fenótipo menos responsivo por parte da microglia pode ser explicada pela necessidade de manter a delicada homeostase do SNC, um fenótipo mais “responsivo” poderia facilmente ativar e cronificar processos inflamatórios exacerbando danos teciduais e sequelas neurológicas. Portanto, mecanismos responsáveis por manter a microglia nesse estado de quiescência fazem-se necessários para preservar o tecido neuronal e respondem pelas principais diferenças entre a microglia e os demais fagócitos mononucleares. Talvez o mais importante mecanismo de manutenção desse estado seja a expressão do microRNA 124 (miRNA-124). Esse microRNA é expresso pela microglia, mas não por monócitos/macrófagos periféricos. Sua expressão mantém essas células em seu estado de baixa responsividade com baixa expressão CD45 e

de MHC de classe II. A transfecção do miRNA-124 em macrófagos derivados de medula óssea resulta em fenótipo semelhante ao da microglia com baixa expressão das mesmas moléculas e com maior resistência à ativação. O estímulo inflamatório com LPS ou INF- γ suprime a expressão de miRNA-124 permitindo à microglia assumir fenótipo ativado com alta expressão de moléculas pró-inflamatórias (76).

Inicialmente essas células foram descritas como células “em repouso” que permaneciam inativas até o momento em que alguma injúria ao SNC iniciava sua atividade. Assim existiam dois conceitos de microglia “em repouso” em contraposição à microglia “ativada” (77). Estudos recentes mostraram que, ao contrário da visão pré-estabelecida, a microglia “em repouso” é na verdade célula de grande atividade que emite processos que escaneiam as superfícies celulares do SNC sendo capazes de avaliar toda a superfície interna do SNC a cada 12 horas (78). Essa descoberta levou a uma nova visão sobre a microglia que, de células em repouso, passaram a ser vistas como células em “estado de vigilância”. Mais que uma simples curiosidade, essa descoberta aumentou o interesse por possíveis funções da microglia no desenvolvimento em processos fisiológicos (79).

O interesse pela microglia aumentou à medida que aumentou o conhecimento sobre a importância da inflamação em processos patológicos do SNC. Ficou evidente que, em diversas doenças, a patologia inicia por uma disfunção da microglia que lesa secundariamente os neurônios. Mais do que ajudar na elucidação de fisiopatologia de doenças neurológicas, os estudos sobre a microglia auxiliaram também na compreensão de doenças psiquiátricas antes vistas como “simples” alterações de neurotransmissores. A presença de comportamento

excessivo de limpeza corporal em camundongos foi sugerida como modelo de transtorno obsessivo compulsivo (TOC). Camundongos com mutações no fator de transcrição Homeo-box-b8 (Hoxb8) apresentam esse distúrbio comportamental que é caracterizado não apenas por comportamento excessivo de autolimpeza como também pela limpeza excessiva de outros animais do grupo. A perda de função dessa proteína na microglia resulta no comportamento anormal que pode ser revertido pela substituição da forma mutante por microglia normal. É interessante o fato de que a expressão desse fator de transcrição não é uniforme por todo SNC, estando presente em diversas áreas, entre elas córtex orbitofrontal, giro do cíngulo anterior e núcleo caudado que, em pacientes com TOC, foram associadas a alterações metabólicas (80, 81).

Um exemplo da importância da microglia em processos patológicos vem do estudo da Síndrome de Rett. Essa síndrome é doença ligada ao cromossomo X cujo gene responsável, MECP-2, foi também associado ao espectro autista (82). Foi demonstrado que a microglia com deficiência do gene MECP-2 libera quantidades excessivas de glutamato que lesam neurônios (83). No modelo animal a irradiação do crânio seguida de transferência adotiva de medula de animais normais resultou na substituição da microglia alterada por microglia “tipo selvagem” com melhora clínica e aumento da sobrevida (84).

A liberação de glutamato pela microglia também foi apontada como mecanismo de lesão em outros modelos de doença. Na esclerose múltipla (EM) o glutamato parece ser uma fonte importante de dano tecidual. Evidências de estudos clínicos e experimentais corroboram essa hipótese. Níveis aumentados de

glutamato são encontrados em líquido cefalorraquiano (LCR) de pacientes com EM ativa em comparação com controles saudáveis ou pacientes com EM sem lesões ativas. Em pacientes com EM secundariamente progressiva, níveis elevados de glutamato no LCR foram associados a pior evolução clínica do déficit neurológico (85, 86). Através de técnica de espectroscopia por ressonância magnética foi possível demonstrar a presença de níveis elevados de glutamato em lesões agudas e na substância branca de pacientes com EM (87). Existem várias possibilidades para explicar a origem do excesso de glutamato presente nas lesões de EM. Uma hipótese é que a microglia e macrófagos infiltrantes do SNC liberam glutamato quando ativados. De fato, quando ativados por LPS, microglia e macrófagos liberam grandes quantidades de glutamato que é produzido pela ação da glutaminase, enzima responsável por catalisar a conversão de glutamina em glutamato mais amônia (88-90). A presença de glutamato em excesso leva a perda neuronal por excitotoxicidade glutamatérgica. O bloqueio farmacológico da ação do glutamato reduz a progressão da doença no modelo animal tanto de doença aguda quanto na fase secundariamente progressiva (91, 92).

A identificação de compostos químicos capazes de atenuar a ativação inflamatória da microglia pode gerar benefícios relevantes para pacientes com doenças do SNC. O acetato parece ser o candidato ideal entre os AGCC, pois é encontrado em maiores concentrações séricas. Em relação a outros fármacos esse composto tem a vantagem de ser um derivado da dieta o que leva a questionamentos sobre possível papel das fibras alimentares não apenas na prevenção de doenças dos cólons, mas também na prevenção de doenças do SNC.

1.6 AUTOFAGIA E IMUNIDADE DO SNC

Autofagia é termo genérico que define processo celular pelo qual partes de conteúdo citoplasmático é degradado por lisossomos. Ocorre tanto em organismos unicelulares quanto em pluricelulares, nesses últimos ocorrendo em todos os tipos de células(93).

Existem 3 classes de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas(93).

Na microautofagia os lisossomos internalizam pequenas partes de citoplasma engolfando-as diretamente através da invaginação da membrana lisossomal(93).

Na autofagia mediada por chaperonas proteínas malformadas são diretamente translocadas para o lúmen lisossomal(93).

A macroautofagia é a forma mais estudada de autofagia. É caracterizada pela presença de autofagossomos que são membranas responsáveis por isolar partes do citoplasma incluindo organelas e material solúvel. Os autofagossomos fundem-se com lisossomos formando, assim, os autolisossomos onde o material englobado é degradado(93).

Neste texto, o termo autofagia será utilizado como sinônimo de macroautofagia.

A mais óbvia função da autofagia é manter a viabilidade celular em situações de privação de nutrientes. No entanto, é errado entender autofagia como simples processo de geração de energia. O processo inicial de indução da autofagia começa antes que os estoques de energia estejam exauridos. Em condições de privação o anabolismo proteico é inibido, porém a síntese de algumas proteínas é mantida ou mesmo aumentada. Essas proteínas são essenciais para a adaptação da célula às condições de privação nutricional, por exemplo: enzimas antioxidantes, proteínas da cadeia respiratória e enzimas lisossomais (94, 95). De fato, a privação de nitrogênio e aminoácidos é o estímulo que induz autofagia mais fortemente e seu principal produto são aminoácidos oriundos das organelas degradadas. Quando os níveis intracelulares de aminoácidos são restaurados à normalidade, a autofagia é inibida. Dessa forma a autofagia funciona como um mecanismo de “feedback” negativo que mantém níveis adequados de aminoácidos permitindo a síntese de proteínas essenciais para adaptação às condições de privação (96).

No fígado, os aminoácidos gerados pela processo autofágico desempenham importante papel na gliconeogênese. Os aminoácidos produzidos pela degradação de organelas são convertidos em glicose via gliconeogênese contribuindo de forma significativa na manutenção dos níveis séricos de glicose. Em modelo murino, quando a autofagia é bloqueada via deleção de ATG7, os animais “knockouts” são capazes de manter níveis glicêmicos semelhantes aos controles selvagens durante as primeiras 24 horas de privação de alimentos. Em seguida, apesar da manutenção da privação de alimentos, os controles elevam seus níveis glicêmicos enquanto os “knockouts” evoluem com redução contínua da glicemia sanguínea.

Logo, fica claro o papel da autofagia na gliconeogênese hepática e manutenção da glicemia (97).

A autofagia permite ainda gerar energia na forma de ATP. Os aminoácidos liberados pelo processo podem ser convertidos em intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. O bloqueio da autofagia em células tumorais via deleção de ATG5 resultou em diminuição dos níveis de metabólitos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos que são produzidos exclusivamente pelas mitocôndrias (citrato, aconitrato, and isocitrato). O mecanismo subjacente a esse processo parece ser um bloqueio da capacidade das mitocôndrias em converter piruvato e ácidos graxos em acetil-CoA e citrato. De fato, as células tumorais deficientes de ATG5 mostraram respiração mitocondrial deficiente o que resultou em acentuada redução dos níveis de ATP e aumento dos níveis de AMP em resposta a privação de nutrientes (98).

A autofagia também é importante no aproveitamento dos estoques de gordura nos hepatócitos. Em condições de privação nutricional, os estoques de gordura na forma de gotículas de triglicérides são hidrolisados liberando ácidos graxos. A autofagia funciona paralelamente à hidrólise degradando gotículas gordurosas por via lisossomal permitindo maior liberação de ácidos graxos livres para β -oxidação (99).

Uma vez induzida autofagia, uma sequência de eventos intracitoplasmáticos é desencadeada iniciando o englobamento de partes do conteúdo citoplasmático e formação de um fagoporo, culminando na fusão dos autofagossomos com os lisossomos (100). O processo é complexo e altamente regulado. Inicialmente

ocorre a formação de um fagoporo que sofre processo de alongação para se transformar em um autofagossomo.

No processo de alongação a proteína ATG12 é conjugada à ATG5 pela ação da proteína ATG7. O complexo ATG5-ATG12 se associa aos fagoporos, mas é liberado e, por isso, está ausente nos autofagossomos. Em outra reação a molécula LC3-I é conjugada a lipídeos fosfatidil etanolamina pela proteína ATG7 dessa maneira formando LC3-II. Ao contrário do complexo ATG5-ATG12, a LC3 permanece ligada aos autofagossomos. Uma vez formados, os autofagossomos são transportados até os lisossomos pelos microtúbulos permitindo a fusão autofagossomo-lisossomo e a finalização do processo (101).

Embora a autofagia seja, em princípio, induzida por estímulos específicos, em condições normais de funcionamento 1 a 1,5% das proteínas celulares sofrem catabolismo autofágico a cada hora. Essa autofagia basal constitui importante mecanismo de “controle de qualidade” das organelas citoplasmáticas e é fundamental para a homeostase de diferentes tipos de células como hepatócitos e neurônios. Evidências indicam que a autofagia basal é seletiva tendo como alvo organelas diferentes dependendo da célula onde ocorre (93).

A proteína p62, também conhecida como sequestrassomo 1/SQSTM1, é um conhecido substrato para autofagia seletiva. É universalmente expressa em células de animais. No desenvolvimento do processo autofágico, a p62 interage com a LC3 sendo incorporada ao autofagossomo e, posteriormente, degradada quanto da fusão deste com os lisossomos (102, 103). Evidências associam a p62 à autofagia

seletiva de agregados de proteínas malformadas (104, 105). Quando a autofagia é bloqueada, ocorre acúmulo de p62 na célula. Por outro lado, a indução de autofagia diminui as quantidades intracelulares de p62 (106, 107). De fato, agregados de proteínas malformadas contendo p62 e ubiquitina são encontrados em doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (108). Essa proteína pode ainda influenciar o funcionamento celular através de interações com outras proteínas não relacionadas à autofagia. Ela pode, por exemplo, se associar ao TRAF6 (do inglês: TNF receptor-associated factor 6) dessa forma influenciando na ativação celular via NF-KB ou atuar na agregação da caspase 8 facilitando a apoptose (109). Por outro lado, em macrófagos estimulados por INF- γ ou CpGs a p62 inibe a expressão de diversas citocinas inflamatórias (IL-12p40, TNF- α , IL-6, IL-1 β e INF- β) enquanto a inibição da síntese da p62 leva a aumento significativo da síntese dessas mesmas citocinas (110).

1.7 RELAÇÃO ENTRE AGCC E AUTOFAGIA

A relação entre AGCC e autofagia foi pouco estudada até o momento. Um único estudo mostrou indução de autofagia pelo propionato. Tang et al. mostraram que o pré-tratamento com propionato induz disfunção mitocondrial com quebra na produção de ATP levando à inibição da via mTorc1 e, dessa forma, estimulando mitofagia. Os autores concluíram que esse efeito pode ser prejudicial em futuras

aplicações de AGCC no tratamento de câncer. Em nenhum momento os autores investigam os mecanismos de ação “clássicos” dos AGCC como ativação de receptores e inibição de histonas (111).

O acetato na forma de acetil-CoA também foi relacionado à autofagia por ser fonte de nutrientes para a célula. Níveis reduzidos de acetil-CoA induzem autofagia por funcionarem como condição de privação de nutrientes. A reposição dos níveis de Acetil-CoA, ao contrário, inibem autofagia por indicar abundância de nutrientes para a célula (112). Portanto, variações fisiológicas dos níveis de Acetil-CoA intracelular são fundamentais na regulação da autofagia. Uma vez que o acetato estimula a produção de acetil-CoA deve, em princípio, inibir a autofagia.

Embora referências diretas a possíveis ações dos AGCC na autofagia sejam escassas, diversos estudos fazem supor que esses compostos devem interferir direta e indiretamente na regulação da autofagia.

Em primeiro lugar, sendo esses compostos fonte de energia para as células, devem inibir autofagia via inibição da via da mTOR. Isso pode ser particularmente importante nos colonócitos que recebem abundantes quantidades de AGCC oriundas da fermentação nos cólons (11).

Por fim, dadas as estreitas relações entre os receptores GPR41 e 43 e o metabolismo energético, pode-se especular interação entre a ativação desses receptores e a regulação da autofagia (113).

2 HIPÓTESE

Diante do exposto, nós formulamos a hipótese de que o acetato modularia a ativação da microglia via TLRs alterando os níveis de expressão de mediadores inflamatórios e glutamato. O efeito modulatório do acetato ocorreria pela ativação de receptores GPR e/ou pela ativação de mecanismos epigenéticos relacionados à atividade de HDAC e/ou HAT. Finalmente, os efeitos imunomoduladores do acetato atuariam, secundariamente, de forma citoprotetora preservando a viabilidade celular em situação de ativação da imunidade inata.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar os efeitos imunomoduladores do acetato na microglia ativada por LPS estabelecendo o efeito resultante na expressão de mediadores inflamatórios e analisar possíveis efeitos citoprotetores secundários às ações na imunidade inata.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estabelecer o papel dos receptores GPR em relação ao efeito do acetato na expressão de mediadores inflamatórios;
2. Determinar o papel de mecanismos epigenéticos em relação ao efeito do acetato na expressão de mediadores inflamatórios;
3. Esclarecer se o mecanismo citoprotetor do acetato é secundário às ações imunomodulatórias ou decorrente de outro mecanismo não relacionado diretamente ao sistema imune; e
4. Elucidar o mecanismo responsável pela preservação da viabilidade celular estabelecendo se ocorre via ativação de receptores, ação epigenética ou através de outros mecanismos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 neonatos (com até 2 dias de vida) fornecidos pelo biotério de camundongos isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP.

Os animais foram mantidos em biotério com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, dotado de sistemas de exaustão e ventilação constantes. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA), protocolo registrado sob número 34, na folha 100 do livro 2.

4.2 REAGENTES

O Acetato foi usado na forma de ácido acético glacial adquirido da empresa Synth (Diadema, SP). Para uso nos experimentos, foi diluído para solução mãe de 1 Molar com pH = 7,4. O LPS, lipopolissacáride from salmonella entérica sorotipo abortus Equi, Cat: L5886. O MTT, Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio, a Tricostatina A, cat: T8552 e a Cloroquina, cat: C6628 foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich, (Saint Louis, Missouri, EUA).

4.3 CULTURA MISTA DE CÉLULAS DA GLIA

Foram utilizados camundongos C57Bl/6J com, no máximo, dois dias de vida. Os animais foram eutanasiados e os encéfalos rapidamente retirados e dissecados, os cerebelos e as meninges foram retirados e desprezados. O material resultante foi transferido para outra placa de petri contendo meio de cultura não suplementado. Ao final da dissecação, as amostras foram levadas para fluxo laminar, o excesso de solução foi removido e foram feitas três lavagens com PBS. As amostras foram, então, cortadas com tesoura cirúrgica ou bisturi com o objetivo de se obter pedaços menores que 1 mm^3 . Uma vez trituradas, foram transferidas para tubos de polipropileno. Em seguida, adicionou-se tripsina (Vitrocell/embriolife, Campinas, Brasil) a 0,25 % (10 ml de solução para 5 encéfalos) e incubou-se em banho-maria a 37°C por até 40 min. A solução foi, então, retirada do banho-maria e soro bovino fetal inativado (SBF) foi acrescentado na proporção de 1:10 para inibir a tripsina. A seguir, as amostras foram dissociadas mecanicamente com uso de pipetas Pasteur através de gentis e repetidos movimentos de sucção. O tecido dissociado foi transferido para novos tubos de polipropileno e centrifugado a 300 rcf por 5 min. Removeu-se o sobrenadante e o precipitado foi re-suspenso em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco), suplementado com 10% de SBF. As células foram

contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas (1800 células por mm²) em placas de petri (Nunc®, 35 mm) previamente tratadas com poli-D-lisina (Sigma).

Uma vez semeadas, as culturas tornam-se confluentes em aproximadamente sete dias. A partir desse momento, forma-se uma monocamada de astrócitos sobre a qual ocorre contínua multiplicação de microglia. A microglia também é encontrada em grande quantidade abaixo da monocamada de astrócitos, fortemente aderida à placa.

Para obtenção de culturas de astrócitos ou microglia com níveis de pureza acima de 95% é necessário separar as duas populações. Para tanto, as culturas foram agitadas rapidamente, isso leva a microglia a se soltar da camada de astrócitos, permitindo que as células sejam coletadas e novamente semeadas com mínima contaminação por astrócitos. A monocamada de astrócitos foi, então, submetida a uma trisinização “leve”, ou seja, usa-se solução formada por tripsina a 0,25% associada a meio de cultura (DMEM ou DMEM/F12) na proporção de 1:3. Após aproximadamente 30 min., a monocamada de astrócitos se desprende da placa enquanto a microglia permanece fortemente aderida. Logo, foi possível separar as duas populações celulares obtendo-se níveis de pureza adequados para a realização dos experimentos de cultura celular tanto com astrócitos quanto com microglia.

4.4 CULTURAS DE LINHAGENS CELULARES

A linhagem celular de microglia C8-B4 foi cultivada em garrafas de 25 cm² com meio DMEM Low, Gibco, Grand Island, NY, EUA, contendo dextrose 1000mg/L e meio Ham (F12) Gibco, Grand Island, NY, EUA, em relação 1:1 e suplementado com Soro bovino fetal, Gibco a 10% e penicilina + Streptomicina 10.000 UI por litro. Nos experimentos de viabilidade celular com MTT, as células foram semeadas em placas de 96 poços, 15.000 células por poço, 100 µl de meio por poço. Nos experimentos de proliferação celular com CSFE, as células foram semeadas em placas de 12 poços, 50.000 células por poço. Em outros experimentos as células foram semeadas em placas de 6 poços, 200.000 células por poço, e deixadas com apenas 1 ml de meio por poço.

4.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA

As culturas foram semeadas em placas de 6 poços. Inicialmente o meio de cultura foi retirado e as culturas lavadas com PBS. As células foram coletadas com 250 µl de Qiazol (Qiagen) por poço. O material foi deixado em gelo seco e estocado em freezer a -80°C. A seguir foi realizada a extração do RNA total seguindo especificamente as instruções do manual do fabricante. O método utiliza solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato que lisa e dissolve componentes celulares mantendo a integridade do RNA. O material foi retirado do freezer, descongelado e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado clorofórmio (Merck) (0,05 mL de clorofórmio/0,25 mL de Qiazol) nas amostras de tecido dissolvidas em Qiazol, as amostras foram, então, centrifugadas a 12.000 rpm em 4°C para a obtenção de duas fases: uma rosa e outra incolor, onde

se concentra o RNA total. O RNA foi reconstituído através da adição de isopropanol (Merck) (0,125 mL de isopropanol/0,25ml de Qiazol) seguida de centrifugação a 12.000 rpm, e ao final desta etapa o RNA foi obtido por precipitação. Após o isolamento, o RNA foi lavado com etanol 75% (Merck) (0,25 mL de etanol/0,25 ml de Qiazol) e novamente centrifugado a 12.000 rpm. O pellet final de RNA foi eluído em água livre de RNase e DNase (20-50 µL) (Gibco).

4.6 QUANTIFICAÇÃO DO RNA

Os RNAs totais (1-2 µL) referentes às amostras de rim de todos os grupos foram quantificados por meio da leitura em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo-Scientific), nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. Para o cálculo da concentração de RNA na amostra foi considerado uma densidade óptica (DO) igual a 1, a qual corresponde a concentração de 40 µg de RNA/mL em solução. A concentração de RNA foi calculada automaticamente pelo software integrado ao espectrofotômetro. Finalmente, a pureza do RNA foi determinada pela razão das absorbâncias 230nm, 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280} e $A_{260}/230$), considerando de boa qualidade as amostras cujo valor da razão variou em torno de 1,8 a 2.

4.7 SÍNTESE DE cDNA

A análise da expressão gênica envolveu duas etapas: 1ª) Realização da síntese do cDNA a partir de aproximadamente 2 µg de RNA total; 2ª) Amplificação do cDNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a síntese de cDNA foi utilizado kit M-MLV Reverse Transcriptase reaction (Promega), seguindo as

recomendações do fabricante. O RNAm foi separado do RNA total obtido através da utilização de primers Oligo-dT (Invitrogen), os quais se ligam à cauda poli-A do RNAm. Uma quantidade de 2 µg de RNA total foi tratado com DNase I (1U/mL) e incubado por 15 minutos a 25°C. A seguir, foi adicionado 2 µl de Oligo (dT) 12-18 Primer (0,1mg/mL) que foi incubado a 65°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram mantidas a 4°C por 5 a 10 minutos. O próximo passo, foi adicionar 1 µL de BSA acetilada (20 mg/mL) (Promega); 10 µl de 5X First Strand Buffer (Invitrogen); 10 µl de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) 10 mM (Promega) e 2 µl de M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ml) (Promega) por amostra. Essa solução foi incubada a 37°C por 1 hora, com posterior incubação a 65°C por 10 minutos. Por fim as amostras foram deixadas em gelo (4°C) por 5 minutos para diminuir rapidamente a temperatura. Para cada amostra testada foi realizado um controle negativo, ou seja, reações incubadas na ausência da enzima transcriptase reversa. Após a síntese do cDNA, as amostras foram diluídas na proporção de 1:3 (em água livre de RNase e DNase, Gibco) e estocadas em freezer a -20 °C para serem utilizadas posteriormente em reações de RT-PCR.

4.8 EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS GÊNICOS - PCR QUANTITATIVO

A transcrição gênica foi quantificada pelo aparelho ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, EUA). O RNA total foi isolado dos

tecidos do SNC usando o método de TRIzol (Invitrogen, USA) e a concentração do RNA foi determinada pela leitura na absorbância de 260 nm por espectrofotômetro. O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 µg de RNA pela transcriptase reversa MML-V (Promega, USA). RT-PCR foi realizado usando o ensaio do PCR quantitativo SYBR Green (Applied Biosystem, USA). A amplificação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 3 µL de cDNA a uma concentração de 5 ng/µL, 1 µL de cada primer (100 pmol/µL), 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Análise dos resultados foi feita pelo programa Sequence Detection Software 1.9 (SDS). A expressão do mRNA foi normalizada pela abundância do HPRT (housekeeping gene). No caso dos genes mt-Nd1 e mt-CO1 o normatizador utilizado foi o mt-H19. Subseqüentemente, todos os resultados foram expressos em relação à expressão das respectivas culturas controles. Foram estudadas as seguintes moléculas: TNF- α , IL-6, GPR41, GPR43, ATG5, ATG12, MFN1, NRF1, CO1 e ND1. Os seguintes primers foram utilizados: HPRT: 5'-CTCATGGACTGATTATGGACAGGA-3' (sense), 5'-GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC-3' (anti-sense), TNF- α : 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3' (sense) 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'(anti-sense), IL-6: 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3' (sense) 5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTC-3' (anti-sense), GPR41: 5'-TGCCTTGGACTCAGCAAGTCA-3' (sense) 5'-CCTGCGGTCCACTCTTTTCTCT-3' (anti-sense) GPR43: 5'-TTTGTACATGTGCTCCGCTGAT-3' (sense) 5'-CCAGTGACTGGTGACACAGAGG-3' (anti-sense) mt-CO1: 5'-CCCAATCTCTACCAGCATC-3' (sense), 5'-GGCTCATAGTATAGCTGGAG-3' (anti-sense); mt-Nd1: 5'-AATCGCCATAGCCTTCCTAACAT-3'(sense), 5'-

GGCGTCTGCAAATGGTTGTAA-3' (anti-sense); mt-H19: 5'-GTACCCACCTGTCGTCC-3'(sense), 5'-GTCCACGAGACCAATGACTG-3'(anti-sense), MFN1: 5' - CACAAATGCACAGAGGGTGC- 3' (sense), 5' -GGCTGCTGGGTTAGAAGGAG- 3'(anti-sense), mNRF1: 5'-CTCACCCCTCCAAACCCAAC 3'(sense), 5' AGCTCTGAATTAACCTCCTGTG 3'(anti-sense).

4.9 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

Os níveis proteicos de TNF- α , IL-6 e IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), foram determinados por ELISA seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o anticorpo de captura foi diluído na concentração de uso e distribuído nos poços em uma placa de 96 poços. Em seguida foi incubado overnight. No dia seguinte, a placa foi lavada e foram adicionadas as amostras e a curva padrão que foram incubadas por 2 horas. Para dosagem do TNF- α as amostras foram diluídas 10 vezes. Após nova lavagem, foi adicionado o anticorpo de detecção, o qual ficou em incubação por mais 2 horas. Em seguida, adicionou-se a solução de estreptavidina-HRP, com posterior adição de solução de substrato (uma mistura de H₂O₂ e tetrametilbenzidina). A reação foi interrompida com a adição de uma solução de H₂SO₄, 2N. Em seguida, foi feita a leitura a 450 nm. Os resultados são apresentados em μ g/ml.

4.10 CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar a expressão de moléculas de superfície, as células foram incubadas com 1:100 de anticorpo monoclonal conjugados com fluorocromos específicos para as molécula CD11b, anti-CD11b *pacific blue*, biolegend (Sam Diego, Ca, EUA) clone: M1/70 cat: 101224. O tempo de incubação foi 30 minutos com as células a 4°C protegidas da luz. Para a análise da expressão de TNF- α intracelular pelas células foi utilizado anticorpo monoclonal anti-TNF- α (BD Diagnostics®, Franklin Lakes, EUA) clone: MP6-XT22 cat: 554420. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 3% de soro fetal bovino (SFB) e ressuspensas em 300 μ l do mesmo tampão. A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton & Dickinson, Mountain View, CA), utilizando-se o software CellQuest (Apple).

4.11 ENSAIO DE 7AAD + ANEXINA V

Primeiro foi preparado tampão de ligação com Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl 1,9 mM, pH: 7,4. O tampão foi esterelizado por filtração e mantido a 4°C.

Inicialmente as células foram coletadas com rápida tripsinização, lavadas uma vez com PBS gelado e depois lavadas uma vez com tampão de ligação. Em

seguida foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado. As células foram então ressuspendidas em solução contendo por amostra: 50 µl de tampão de ligação, 1 µl de 7AAD, Biolegend, San Diego, CA, EUA. e 0,7 µl do anticorpo anexina V FITC, Biolegend, San Diego, CA, EUA. Após 20 minutos de incubação em temperatura ambiente e protegido da luz, foram acrescentados 200 µl de tampão de ligação por amostra. As células foram mantidas em gelo e imediatamente levadas ao citômetro.

4.12 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

Para análise de viabilidade celular por MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) as células foram semeadas em placas de 96 poços. Nos experimentos com microglia C8-B4 foram semeadas 15000 células por poço, 24 a 48 horas antes do tratamento.

Inicialmente o MTT foi diluído em PBS a 5 mg/ml e vigorosamente agitado em vórtex até a completa diluição. O MTT foi sempre utilizado no mesmo dia em que foi diluído. Para aferição da viabilidade celular, o meio de cultura foi descartado e substituído por meio não suplementado, 180 µl por poço. Em seguida cada poço recebeu MTT 5mg/ml, 20 µl por poço. As placas eram, então, deixadas a 37 °C por períodos de 2 horas protegidas da luz. Ao término do período a solução de meio e MTT era cuidadosamente retirada e substituída por DMSO 100 µl por poço. A placa era, então, levada ao leitor de ELISA e agitada até a completa homogenização e, imediatamente, lida no comprimento de onda de 570 nM.

O leitor de ELISA utilizado foi o Versamax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices (Sunnyvale, California).

4.13 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR POR CSFE

As células foram coletadas após rápida tripsinização e a tripsina inativada com meio suplementado com SBF 10%. As células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS. Foram novamente centrifugadas e ressuspensas 1×10^6 células por ml em volume total de 3 ml. Foi acrescentado 1 μ l de CSFE a 5mM. Em seguida foram incubadas em banho maria a 37°C, protegidas da luz, por 20 minutos. O CSFE (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester) foi inativado com 7 ml meio suplementado com SBF a 10% incubando em banho maria por 5 minutos. Nova centrifugação e as células ressuspensas em 3 ml de meio suplementado (1×10^6 células por ml) e semeadas em placas de 12 poços com 500 μ l de meio por poço. Após 24 horas foram tratadas com diferentes doses de acetato e 4 dias após o tratamento foram coletadas com rápida tripsinização e levadas ao citômetro.

Um grupo de células foi semeado sem tratamento com CSFE para servir de controle negativo e um segundo grupos de células sem marcação com CSFE, foram marcadas no dia da citometria para servirem de controle positivo.

4.14 TESTE DE GRIESS

A quantificação indireta das concentrações de NO no meio foi realizada através da técnica de teste de Griess. Amostras de 50 µl de meio das culturas de microglia C8-B4 foram acrescentadas a 50 µl do reagente de Griess previamente preparado a partir das orientações do fabricante, Sigma-Aldrich. A seguir a amostra foi incubada com o reagente de Griess ou PBS (controle negativo) durante 10 minutos. Após a incubação foi feita a análise da amostra no leitor de Elisa em comprimento de onda de 450 e 570 nm, descontando os valores obtidos do controle negativo.

4.15 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) INTRACELULAR POR DAF-FM

Para dosagem de NO intracelular foi utilizado DAF-FM, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA.

DAF-FM diacetato é composto não fluorescente permeável às membranas celulares capaz de se difundir passivamente para o meio intracelular onde, ao reagir com NO, forma compostos com propriedades fluorescentes impermeáveis às membranas celulares.

Anteriormente ao experimento o DAF-FM foi diluído em DMSO (5 mM) e aliquotado.

As células foram semeadas em *Chambers slides* de 8 poços. Para marcação com DAF-FM, o meio foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS e deixadas em PBS 100 µl por poço. Foi acrescentado DAF-FM para concentração final de 5 µM por poço e deixadas 1 hora a 4 °C protegidas da luz. Em seguida, o PBS foi removido e substituído por PBS puro e as células novamente incubadas a 4 °C por 30 minutos. Após o término da segunda incubação, a lâmina foi levada ao microscópio de fluorescência onde foram feitas fotos no comprimento de onda equivalente a fluoresceína (FITC) no aumento de 20 vezes e com tempo de exposição de 1 s. Foram feitas, pelo menos, 10 fotos por campo.

4.16 ENSAIO CBA

Para quantificar citocinas em meio de cultura foi utilizado o Kit CBA (*cytometric bead array*) (BD Biosciences) de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, seis tipos de beads com diferentes intensidades de fluorescência são conjugados com anticorpos específicos para as citocinas testadas.

Os tubos foram preparados com o meio coletado das amostras, a solução com as beads e a solução do reagente de detecção (*mouse inflammation PE detection*) na proporção de 1:1:1. A solução resultante foi encubada por 2 horas em temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida foi centrifugada e ressuspendida em “wash buffer” e levada ao citômetro.

4.17 ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE LISOSSOMOS

Esse ensaio tem como base o uso da sonda acidotrópica, LysoTracker® Red DND-99 (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) que é formado por um fluorocromo ligado a uma base fraca. Esse composto penetra livremente nos compartimentos celulares e se concentra nas organelas de pH ácido. O mecanismo de retenção nessas organelas não foi completamente elucidado, mas, provavelmente, envolve protonização e retenção nas membranas celulares.

As células foram semeadas em placas especiais com 35 mm de diâmetro equipadas com lamínula na parte central com 14 mm de diâmetro e espessura de 0,16-0,19 mm (Mat Tek, Glass Bottom Microwell dishes, Ashland, MA, EUA). Para marcação com LysoTracker, o meio de cultura foi trocado por meio pré-aquecido a 37 °C com lisotracker na concentração de 75 nm. As células foram deixadas a 37 °C e protegidas da luz por 1 hora. Em seguida o meio de cultura com lisotracker foi retirado e as células lavadas com PBS. As culturas receberam novo meio de cultura e foram fotografadas em microscópio Zeiss LSM 780.

Para determinar o número de lisossomos em cada célula foi utilizado o programa ImageJ (versão 1.38) utilizando-se os mesmos parâmetros para todas as fotos. Inicialmente, no programa ZEN 2012 (Black edition) (64 bit), (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), no canal vermelho, todas as fotos foram ajustadas para Gama 10. Em seguida, as imagens foram analisadas no programa image j.

Na aba “Image”, no comando “Type” foi escolhida a opção “8 bit”. Em seguida, na mesma aba “Image”, foram escolhidos os comandos “adjust” e “threshold” e os parâmetros ajustados para “10 – 90 – default – B&W” e, por fim, o comando “apply”. Depois na aba “Analyze” foi escolhido o comando “3D object counter” e o parâmetro “threshold” foi ajustado em 128 e o parâmetro “slice” ajustado em 1. Por fim, o parâmetro size filter foi ajustado para min = 1 e max = 89951. O número de objetos em cada campo foi dividido pelo número de células no campo de forma a obter a média de lisossomos por célula. Para cada grupo, pelo menos 5 campos foram contados. Para efetuar a análise estatística, foi atribuído um “peso” para cada campo que era equivalente ao número de células no campo, ou seja, se o campo apresentasse 10 células o peso seria 10, se o número de células fosse 40, então o peso seria 40. Na confecção da planilha, para cada campo, o número médio de lisossomos por célula foi multiplicado pelo “peso” atribuído a cada campo, por exemplo, número médio de lisossomos por célula = 10, peso (número de células no campo) = 20, então $10 \times 20 = 200$. Após a realização dos ajustes descritos, foi efetuada a análise estatística.

4.18 ENSAIO COLORIMÉTRICO PARA DOSAGE DE GLUTAMATO

Para dosagem de glutamato no meio de cultura foi utilizado o Kit comercial “Glutamate assay kit”, abcam (Cambridge, UK) seguindo as orientações do fabricante.

Inicialmente, 10 µl do sobrenadante de cada amostra foram adicionados a cada poço em uma placa de 96 poços com fundo chato contendo 40 µl da solução assay buffer. Em seguida, foi preparada solução contendo, para cada amostra: 90 µl de “assay buffer”, 8 µl da solução “glutamate developer” e 2 µl da solução “glutamate enzyme mix”. Cada amostra foi tratada com 100 µl da solução sendo, em seguida, incubada a 37 °C por 30 minutos protegida da luz. Por fim, a leitura foi realizada em leitor de elisa, Versamax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, (Sunnyvale, California) no comprimento de onda de 450 nm.

4.19 ENSAIO MITOSOX

Para avaliação da produção de superóxido em células vivas foi utilizado ensaio Mitosox, Molecular Probes® (Eugene, Oregon, EUA). Inicialmente o reagente em pó (50 µg) foi diluído em 13 µl de DMSO para fazer solução estoque a 5 mM. Essa solução foi diluída na proporção de 1 µl da solução para 9 µl de DMSO para fazer solução de trabalho.

As células ainda aderidas foram tratadas com 1 µl da solução de trabalho para cada 1 ml de meio e incubadas durante 10 minutos a 37 °C protegidas da luz. Em seguida foram lavadas 2 vezes com PBS e coletadas com rápida tripsinização.

As células foram então centrifugadas e lavadas com tampão FACS e, finalmente, ressuspensas em tampão FACS e levadas ao citômetro para leitura da intensidade no canal FL2.

4.20 ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE HDAC

Para mensurar a atividade das Histonas deacetilases foi utilizado o Kit *HDAC activity colorimetric assay kit* (BioVision Research Products, Mountain View, CA, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

Inicialmente, 60 µg de lisado celular foi diluído em água destilada para um volume final de 85 µl. Em seguida foram adicionados 10 µl de tampão e 5 µl de substrato colorimétrico. A solução resultante foi incubada a 37 °C por 60 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 10 µl do reagente “lysine developer” e a solução foi, novamente, incubada a 37 °C por 30 minutos.

Para o controle positivo, foi utilizado extrato nuclear de células Hela. Para o controle negativo, amostras foram tratadas com tricostatina A.

A leitura foi realizada em leitor de elisa, Versamax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, (Sunnyvale, California) no comprimento de onda de 400 nm.

4.21 ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE HAT

Para mensurar a atividade das Histona acetiltransferases foi utilizado o Kit *HAT activity colorimetric assay kit* (BioVision Research Products, Mountain View, CA, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

Inicialmente, 50 µg de lisado celular foi diluído em água destilada para um volume final de 40 µl. Em seguida foram adicionados 68 µl do reagente “assay mix”. A solução resultante foi incubada a 37 °C por 60 minutos.

A leitura foi realizada em leitor de elisa, Versamax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, (Sunnyvale, California) no comprimento de onda de 440 nm.

4.22 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE CICLO CELULAR

A avaliação do ciclo celular foi feita utilizando-se o Kit *BD Cycletest™ Plus - DNA Reagent Kit*, BD Biosciences, conforme as orientações do fabricante. Brevemente, as células foram coletadas com rápida tripsinização, centrifugadas e ressuspensas 3 vezes em PBS em temperatura ambiente.

Em seguida as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas no reagente A. Após 10 minutos foi acrescentado reagente B e, após mais 10 minutos, reagente C a 4 °C.

Após 10 minutos a 4 °C protegidas da luz, as células foram lavadas ao citômetro.

4.23 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR AZUL DE TRIPAN

Para avaliar a viabilidade celular pela técnica de azul de tripan, as células foram coletadas com rápida tripsinização. Em seguida foram centrifugadas e ressuspensas em PBS. Uma alíquota de 10 µl das células foi então homogenizada com solução de azul de tripan 0,4% (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:1.

Após 2 minutos, 10 µl da solução células + Azul de tripan foram transferidos para câmara de Neubauer e contados em microscópio óptico fazendo-se a diferenciação entre as células marcadas (não viáveis) e as não marcadas (viáveis) com o corante.

4.24 WESTERN BLOTTING

Para a detecção de proteínas, as amostras de culturas foram lisadas com tampão RIPA (50 mM TrisHCl pH7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS), contendo inibidores de proteases e fosfatases (Complete-EDTA e PhosSTOP, Roche). O lisado celular foi submetido à dosagem de proteínas pelo kit Pierce™

BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, (Waltham, EUA) seguindo as informações do fabricante. Para cada amostra, foi usado 30 µg de proteína do extrato tecidual para a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As amostras foram submetidas a uma corrida por 1 hora e 30 minutos à 80 Volts (Bio-Rad). Em seguida o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad), sendo a transferência realizada por 1 hora à 80 Volts. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente com TBS-T [(Tris HCl 20 mM, NaCl 136 mM, pH 7.6) Tween 20 (0,05%)] + 5% (BSA, Sigma). Após o bloqueio foi realizada a incubação com os anticorpos primários (β -Actina/1:1000, Sigma; p62 / 1:1000, Cell Signaling) diluídos em TBS/BSA 5% à 4°C, sob agitação, por 18 horas. Em seguida, a membrana foi lavada com solução de TBS, por duas vezes de 10 minutos e incubada com o anticorpo secundário (Anti-mouse ou Anti-rabbit peroxidase/1:5000, Sigma), por 2 horas, a 4 °C, sob agitação, seguida de posterior lavagem da membrana por 3 vezes de 15 minutos, com TBS Tween 20 (0,05%). Em seguida a membrana foi revelada por quimioluminescência, utilizado o Kit ECL para visualização das bandas referentes às proteínas de interesse. As imagens foram adquiridas no aparelho GEN-BOX. Foram utilizados os software GeneSnap (Syngene) e Tools Gene (Syngene) para identificar, analisar e quantificar as bandas.

4.25 ENSAIO COLORIMÉTRICO PARA DOSAGEM DE LDH EM MEIO DE CULTURA

O meio de cultura foi coletado e centrifugado a 450 rcf por 5 min em temperatura ambiente com o objetivo de eliminar debris e células mortas.

Foi utilizado o Kit comercial Desidrogenase Láctica, ref 37, Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG. Inicialmente foram preparados tubos de ensaio contendo 10 µl das amostras e 200 µl de reagente substrato. Também foram preparados tubos contendo 10 µl das amostras e 200 µl de tampão e tubos “padrão” contendo 10 µl do padrão e 200 µl do tampão.

Os tubos foram incubados em banho maria a 37 °C por 2 minutos. Foram adicionados 40 µl de reagente de cor ao controle e às amostras. Os tubos foram, novamente, incubados em banho Maria a 37 °C por, exatamente, 5 minutos e, em seguida, foi adicionado reagente estabilizador, 400 µl por tubo.

Após período de 5 minutos em temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi determinada no comprimento de onda de 500 nm.

4.26 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os grupos, em relação às variáveis do estudo, foram avaliadas usando o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de “p” for menor que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM C8-B4

A linhagem C8-B4 foi previamente caracterizada em nosso laboratório em relação à produção de citocinas. Foram feitos experimentos adicionais para caracterizar a produção de NO em resposta a estímulos como IFN- γ e LPS (Figura 1) além de cinética de proliferação (Figura 2).

Figura 1 - Produção de óxido nítrico por células da microglia em resposta a ativação por diferentes doses de LPS ou IFN- γ . Culturas de Microglia (C8-B4) foram tratadas com diferentes doses de LPS (0,02; 0,05 e 0,25 $\mu\text{g/ml}$) e IFN- γ (10; 50; 100 ng/ml). Após 48 horas a quantidade de NO foi aferida de forma indireta pela medida da quantidade de nitritos no meio de cultura através da técnica de Griess. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média (n = 6 culturas por grupo).

A resposta ao IFN- γ foi dose dependente (Figura 1) e mais proeminente que a obtida com LPS que, por sua vez, não mostrou uma clara relação dose resposta

com a dose de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ sendo menos efetiva que as doses de 0,02 e 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 1).

Figura 2 - Evolução da microglia C8-B4 em cultura. Culturas de Microglia (C8-B4) foram semeadas (40.000 células por poço) em placas de 6 poços e cultivadas com meio DMEM Low + Ham's F12 (1:1) com 10% de SBF e mantidas em estufa com CO₂ a 5%. Fotos representativas de culturas com 1; 2; 3; 4; 7 e 10 dias após a semeadura.

5.2 RESPOSTA DA MICROGLIA C8-B4 A DIFERENTES DOSES DE ACETATO

Em seguida foi avaliada a resposta da linhagem a diferentes concentrações de acetato. As células foram tratadas com 4 diferentes concentrações de acetato (2,5; 12,5; 25,0 e 50,0 mM) por 48 horas e a viabilidade celular aferida por técnica de MTT). As concentrações de 12,5 e 25 mM não mostraram efeitos na viabilidade/proliferação celular. As concentrações de 2,5 e 50 mM, no entanto,

alteraram os parâmetros do teste com efeitos opostos, a concentração de 2,5 mM estimulou a proliferação celular ($p < 0,05$) enquanto a concentração de 50 mM reduziu a viabilidade/proliferação celular ($p < 0,001$) (Figura 3).

Figura 3 - Efeito do acetato na proliferação de células da Microglia. Culturas de microglia (C8-B4) foram tratadas com diferentes doses de acetato. Após 48 horas o meio de cultura foi descartado e a quantidade de células nos poços avaliada pela técnica de MTT. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média, $n = 8$ por grupo.

O resultado observado com a concentração de 50 mM poderia ocorrer tanto por efeito tóxico de indução de morte celular quanto por efeito antiproliferativo como observado na literatura para outros AGCC como o butirato (68). Para esclarecer essa dúvida, as células foram previamente marcadas com CFSE (1,5 μ M) semeadas e tratadas por 4 dias com 3 concentrações de acetato (2,5; 25,0 e 50,0 mM). A concentração de 50mM mostrou proeminente efeito antiproliferativo ($p < 0,001$) enquanto a concentração de 2,5 mM não alterou a proliferação celular.

Por sua vez, a concentração de 25 mM mostrou discreto efeito antiproliferativo ($p < 0,05$) (Figura 4).

Figura 4 - Efeito do acetato na proliferação de células da Microglia. Culturas de microglia (C8-B4) foram marcadas com CFSE e semeadas em placas de 12 poços. Em seguida foram tratadas com acetato em diferentes doses (2,5; 25 e 50 mM) e, após 4 dias, foram coletadas e avaliadas por citometria de fluxo. Em A Histogramas representativos de cada grupo. Em B os histogramas foram reunidos em um único gráfico (controle: linha preta, acetato 2,5 mM: linha verde, acetato 25 mM: linha vermelha, acetato 50 mM: linha azul). Em C mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de cada um dos grupos. O gráfico representa um de 2 experimentos independentes cada um com $n = 3$ culturas por grupo. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média.

Com base nos resultados obtidos nos experimentos de MTT e CFSE optamos por utilizar o acetato na concentração de 25mM. Essa concentração foi escolhida porque não mostrou efeitos antiproliferativos significativos quando do tratamento

de 48 horas embora tenha demonstrado efeito marginalmente significativo quando o período de tratamento foi de 4 dias.

5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE AGCC

O próximo passo foi investigar a expressão de receptores para AGCC na linhagem C8-B4. A expressão gênica desses receptores foi avaliada por RT-PCR. Neutrófilos extraídos de lavado peritoneal de camundongos foram utilizados como parâmetro de comparação. Células do sistema imune apresentam, em princípio, baixa expressão de GPR41 e alta expressão de GPR43 (19). Na comparação com os neutrófilos, a microglia C8-B4 apresentou menor expressão de GPR41 e maior expressão de GPR43 (Figura 5). O RT-PCR não confirma que esses receptores sejam funcionalmente expressos na superfície celular, porém esses resultados enfatizam a necessidade de investigar o papel desses receptores como um dos possíveis mecanismos de ação nas respostas ao acetato.

Figure 5 - Expressão gênica de receptores de AGCC em culturas de microglia. A expressão de mRNA dos receptores GPR41 e 43 foi avaliada por PCR em tempo real em culturas de microglia. Neutrófilos de lavado peritoneal de camundongos tratados com zimosan 2mg/ml i.p. por 6 horas foram usadas para comparação. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média (GPR41 n = 3, GPR43 n = 2).

5.4 EFEITO DO ACETATO NA VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar o efeito do acetato na produção de citocinas foram desenhados experimentos onde a microglia foi tratada com acetato e, após 1 hora, estimulada com LPS 0,25 μ g/ml. No entanto, quando o tempo de tratamento com LPS foi de 48 horas, um fenômeno inesperado foi observado. O acetato mostrou efeito citoprotetor nas células tratadas com LPS, ou seja, nos poços tratados com LPS havia grande quantidade de células mortas, e nos poços previamente tratados com acetato o número de células mortas era claramente menor. Não surpreende que o LPS tenha induzido morte celular na microglia uma vez que a apoptose induzida por LPS é fenômeno comum em fagócitos mononucleares (114), porém a indução

de citoproteção pelo acetato foi surpreendente, pois na literatura científica os AGCC são descritos como substâncias pró-apoptóticas (21, 66, 69).

Com o objetivo de quantificar o efeito citoprotetor do acetato, a microglia foi tratada com diferentes concentrações de acetato (2,5; 25,0 e 50 mM) e, após 30 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. Nos grupos acetato/LPS as células foram lavadas com PBS e receberam meio novo antes do tratamento com LPS. A porcentagem de células mortas em cada grupo foi aferida por ensaio de 7AAD que tem a capacidade de impregnar células mortas, mas não penetra a membrana celular de células viáveis. O tratamento com acetato foi efetivo em reduzir a porcentagem de células marcadas com 7AAD tanto nos grupos estimulados com LPS quanto nos grupos tratados apenas com acetato ($p < 0,001$). Nos grupos onde houve lavagem e troca de meio o resultado foi similar ($p < 0,001$) (Figura 6) sugerindo mecanismo citoprotetor que é efetivo tanto em reduzir a apoptose induzida por LPS quanto em reduzir as taxas basais de morte celular na cultura.

Figura 6 - Efeito do acetato na viabilidade celular. Culturas de microglia foram tratadas com diferentes doses de acetato e, após 30 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. Nos grupos “lavadas” as células foram mantidas 30 min com acetato, em seguida o meio foi retirado e as culturas lavadas com PBS antes de receberem novo meio e LPS. As células foram mantidas com LPS por 48 horas, ao término desse período, foram coletadas e marcadas com 7AAD e analisadas por citometria de fluxo. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. Todos os grupos com diferenças significativas em relação ao grupo LPS 0,25 µg/ml ($p < 0,001$). As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média ($n = 3$ culturas por grupo).

Ensaio de ciclo celular também são úteis para avaliar taxas de apoptose e/ou necrose que podem ser avaliadas através de um “gate” específico para esses parâmetros. As culturas de microglia foram tratadas como no experimento anterior e analisadas por ensaio de ciclo celular. Os resultados mostraram redução das taxas de apoptose/necrose na comparação entre os grupos controle e acetato ($p < 0,01$) e também na comparação entre os grupos LPS e acetato + LPS ($p < 0,001$) (Figura 7). A análise das porcentagens de células nas fases do ciclo celular mostrou redução das porcentagens de células nas fases G0/G1 nos grupos tratados com acetato ($p < 0,001$, grupo controle em relação ao grupo acetato e $p < 0,01$, grupo LPS em relação ao grupo acetato + LPS). Esses mesmos grupos mostraram aumento das porcentagens de células tanto na fase “S” ($p < 0,001$, grupo controle em relação ao

grupo acetato e grupo LPS em relação ao grupo acetato + LPS) quanto nas fases G2/M ($p < 0,01$, grupo controle em relação ao grupo acetato e $p < 0,001$, grupo LPS em relação ao grupo acetato + LPS) (Figura 7).

Figura 7 - Efeito do acetato no ciclo celular de células da microglia. Culturas de microglia (C8-B4) foram tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. As células foram mantidas com LPS por 48 horas e, ao término desse período, foram coletadas, marcadas e analisadas por citometria de fluxo. Em A histogramas representativos de cada um dos grupos. Na parte superior os “gates” e os histogramas são mostrados por inteiro. Na parte inferior os mesmos histogramas são mostrados em detalhes. Em B os histogramas foram reunidos em gráficos representativos das fases do ciclo celular. Análise estatística: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média (n = 3 culturas por grupo).

Em relação a apoptose/necrose, esses resultados confirmam o experimento anterior, ou seja, o tratamento com acetato reduziu as taxas basais de morte celular e taxas da morte celular induzida por LPS. Em relação a análise do ciclo

celular o experimento sugere que, surpreendentemente, as culturas tratadas com acetato apresentavam maior taxa de proliferação celular após 48 horas de tratamento (Figura 7).

Nos ensaios para avaliação de morte celular que utilizam apenas 7AAD, uma grande porcentagem de células em apoptose que ainda não apresentam ruptura da membrana celular pode não ser marcada dando resultados falsos em relação as porcentagens de células que estão, de fato, perdendo viabilidade. Deve-se enfatizar ainda que a morte de fagócitos mononucleares induzida por LPS ocorre, em princípio, pela indução de apoptose (114). Para avaliar a apoptose de células tratadas com acetato e/ou LPS, as células foram marcadas com 7AAD e anexina. Os resultados mostraram porcentagens semelhantes de células marcadas com anexina nos grupos LPS e acetato + LPS com diferenças estatisticamente significativas apenas na marcação por 7AAD ($p < 0,001$, grupo LPS em relação ao grupo acetato + LPS) (Figura 8). Esses resultados sugerem que a morte celular após o tratamento com LPS ocorre, como esperado, por apoptose e as células marcadas com 7-AAD representam, em sua maioria, apoptose tardia.

5.5 EFEITO DO BLOQUEIO DO BLOQUEIO DA PROTEÍNA $G_{\alpha i}$ NA VIABILIDADE CELULAR DA MICROGLIA

Diante da constatação da citoproteção induzida por acetato, o próximo passo foi verificar o mecanismo subjacente ao fenômeno. Em estudos prévios a ativação de receptores GPR43 foi associada à melhora de parâmetros inflamatórios

(21), por conseguinte, a primeira hipótese considerada foi de que o acetato poderia induzir citoproteção pela ativação de receptores GPR43. Para verificar essa hipótese, a microglia foi tratada com toxina pertussis (PTX) antes do tratamento com acetato e LPS. O bloqueio da proteína $G\alpha$ inibitória pela PTX não reverteu a citoproteção induzida por acetato. Na citômetria de fluxo a porcentagem de células marcadas com 7AAD foi semelhante nos grupos Acet + LPS e PTX + Acet + LPS ($p>0,05$, comparação entre grupo acetato + LPS e grupo acetato + LPS + PTX) (Figura 9).

A

B

CTR

Acet

LPS

Acet+LPS

Figura 8 - Efeito do acetato na apoptose induzida por LPS em células da microglia. Culturas de microglia foram tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. As células foram mantidas com LPS por 48 horas, ao término desse período, foram coletadas e marcadas com 7AAD e anexina V e analisadas por citometria de fluxo. A estratégia de “gates” é mostrada em A (Anexina V) e em B (7AAD), (CTR: controle, Acet: acetato 25 mM, LPS: LPS 0,25 µg/ml, ACET+LPS: acetato 25 mM + LPS 0,25 µg/ml). A Cisplatina foi usada como controle positivo. Em C os gráficos mostram as médias dos valores dos “gates”. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média (n = 3 culturas por grupo).

A necessidade de aferição por citometria de fluxo constitui inconveniente no caso de culturas aderidas, pois o simples ato de destacar as células da superfície da placa, seja ele por método químico ou mecânico, já é capaz de induzir morte celular podendo gerar resultados falso positivos bem como produzir grandes quantidades de debris que prejudicam a confecção dos “gates” na citometria. Com o objetivo de eliminar esse inconveniente e verificar com maior clareza o efeito da PTX no processo, o experimento com PTX foi repetido, porém, dessa vez, a viabilidade celular foi aferida pelo método de MTT. Os resultados obtidos

confirmaram os achados com 7AAD, ou seja, o acetato apresentou efeito citoprotetor quando administrado 60 min antes do LPS ($p < 0,001$, grupo LPS em comparação com grupo Acetato + LPS), a PTX não reverteu a citoproteção induzida pelo acetato ($p < 0,001$ grupo LPS em relação ao grupo acetato + LPS + PTX e $p > 0,05$, grupo Acetato + LPS em comparação ao grupo acetato + LPS + PTX) (Figura 10).

Com base nos dados obtidos com 7AAD e MTT a hipótese de efeito citoprotetor mediado pelo receptor GPR43 foi descartada.

A

Não marcadas

Controle

Acetato 25mM

LPS 0,25 μ g/ml

Acet + LPS

Acet + LPS +TP

T Pertussis 100 ng/ml

B

Figura 9 - Efeito do acetato na viabilidade celular, efeito do bloqueio da proteína G inibitória pela toxina pertussis. Culturas de microglia foram tratadas com acetato 25 mM e, após 30 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. A toxina pertussis (PTX) 100 ng/ml foi administrada 3 horas antes do acetato. As células foram mantidas com LPS por 48 horas, ao término desse período, foram coletadas e marcadas com 7AAD e analisadas por citometria de fluxo. Em A análise da citometria por estratégia de gates. Em B gráfico mostrando as médias dos valores dos gates. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média (n = 5 culturas por grupo).

Figura 10 - Efeito do acetato na viabilidade celular, efeito do bloqueio da proteína G inibitória pela toxina pertussis. Culturas de microglia foram tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. A toxina pertussis (PTX) 100 ng/ml foi administrada 3 horas antes do acetato. No grupo Acet / lavadas/ LPS as culturas foram tratadas com acetato por 90 minutos, depois lavadas com meio e então tratadas apenas com LPS. As células foram mantidas com LPS por 48 horas, ao término desse período, a viabilidade celular foi aferida pela técnica de MTT. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média ± Desvio padrão da média.

5.6 EFEITO DO ACETATO NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO

Os AGCC são descritos como substâncias com propriedades anti-inflamatórias. Efeitos antiinflamatórios já foram, inclusive, descritos para o butirato e acetato na microglia (48, 58, 59). Com base nessas informações foi formulada a hipótese de que a citoproteção induzida pelo acetato ocorreria pela inibição da produção de mediadores inflamatórios. Para testar essa hipótese o tratamento anterior foi repetido e o NO dosado através da reação fluorescente da sonda DAF e de forma indireta pela aferição das quantidades de nitritos no meio de

cultura (teste de Griess). Em ambos os casos, não houve diferenças entre os grupos LPS e acetato + LPS, ou seja, o acetato não reduziu a produção de NO induzida pelo LPS ($p>0,05$) (Figura 11).

Esses resultados mostram que a melhora observada na viabilidade celular não ocorre pela redução na produção espécies reativas de nitrogênio.

Figura 11 - Produção de óxido nítrico em culturas de microglia. Culturas de Microglia (C8-B4) foram tratadas com acetato e, após 60 min, estimuladas com LPS. As células foram mantidas em meio com acetato e LPS por 48 horas. Após esse período, foram marcadas com a sonda DAF e a quantidade de óxido nítrico intracelular aferida em microscópio de fluorescência pela medida de fluorescência por campo. A quantidade de NO no meio de cultura foi também aferida de forma indireta pela medida da quantidade de nitritos por técnica de Griess. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média ($n = 3$ culturas por grupo).

5.7 EFEITO DO ACETATO NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Citocinas inflamatórias como, por exemplo, TNF- α e IL-1 β podem induzir morte celular pela ativação de receptores de morte (115) ou pela indução de

piroptose (116). Portanto, a secreção dessas citocinas em resposta ao estímulo com LPS poderia levar a ativação autócrina nas culturas de microglia induzindo, dessa forma, morte celular. Um efeito anti-inflamatório do acetato de inibir a secreção dessas citocinas poderia explicar a melhora nas taxas de viabilidade celular. Para verificar essa hipótese e também para estudar os efeitos do acetato na produção de citocinas inflamatórias, meio de cultura foi coletado após 48 horas de tratamento e a concentração de citocinas avaliada por ensaio CBA. Também foi avaliada a concentração de IL-1 β por técnica de elisa.

Em relação a IL-1 β , as concentrações no meio de cultura ficaram abaixo do limite de detecção do ensaio (dados não apresentados). O ensaio CBA mostrou redução da secreção de IL-6 nos grupos acetato + LPS em relação aos grupos LPS ($p < 0,001$). Em relação ao TNF- α , surpreendentemente, ocorreu aumento da produção com concentrações significativamente maiores nos grupos tratados com acetato e LPS em relação aos grupos tratados com LPS ($p < 0,001$) (Figura 12). Esse resultado não era esperado porque, na literatura disponível, em geral os AGCC são descritos como substâncias com propriedades anti-inflamatórias. Era esperada, portanto, redução da secreção de TNF- α ou ausência de efeito, mas não aumento.

Figura 12 - Efeito do acetato na produção de citocinas por células da microglia. Culturas de microglia foram tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. As células foram mantidas com LPS por 48 horas, ao término desse período, o meio de cultura foi coletado para ensaio CBA. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média, n = 3 por grupo.

Com o objetivo de confirmar os resultados do ensaio CBA, a expressão gênica de TNF- α e IL-6 foi aferida pela técnica de PCR quantitativo. Os resultados mostraram que o aumento da expressão de TNF- α e a diminuição da expressão da IL-6 ocorrem na expressão gênica dessas citocinas ($p < 0,01$, TNF- α grupo LPS em comparação com grupo acetato + LPS e IL-6 $p < 0,001$, grupo LPS em comparação com grupo acetato + LPS) (Figura 13). Esses resultados confirmam os resultados obtidos no ensaio CBA e sugerem que o mecanismo de ação do acetato ocorre ao nível da expressão gênica.

Figure 13 - Expressão gênica de TNF- α e IL-6 em culturas de microglia. Culturas de microglia C8-B4 foram tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 μ g/ml. Após 48 horas do estímulo com LPS, as células foram coletadas em trizol. A expressão gênica de TNF- α e IL-6 foi avaliada por PCR em tempo real. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média.

O aumento observado na produção de TNF- α pela microglia poderia representar um efeito tardio decorrente da depleção de acetato após 48 horas de tratamento. Essa situação levaria a um efeito rebote pró-inflamatório após efeito anti-inflamatório inicial. Esse aumento de TNF- α poderia também representar efeito tóxico da dose de acetato utilizada. Para avaliar essas duas hipóteses, a resposta da microglia ao tratamento foi testada através de curva temporal e dose resposta. A curva dose resposta mostrou que o efeito do acetato é dose dependente com efeito estatisticamente significativo a partir da concentração de 12,5 mM (valores de p respectivamente em relação ao grupo LPS, acetato 12,5 mM, $p < 0,01$, acetato 25 mM e 50 mM, $p < 0,001$) (Figura 14A). Em relação à curva temporal, o acetato aumentou a expressão de TNF- α em todos os tempos testados

com a maior diferença observada no tempo de 12 horas ($p < 0,001$ para todos os tempos) (figura 14B). Esses resultados descartam a possibilidade de efeito tóxico da dose utilizada de acetato e também a possibilidade de um efeito tardio decorrente da perda de um efeito anti-inflamatório inicial.

Figura 14 - Efeito do acetato na produção TNF- α por células da microglia. Culturas de microglia foram tratadas com acetato e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Em (A) as culturas foram tratadas com diferentes doses de acetato e o sobrenadante colhido 48 horas após estímulo com LPS. Em (B) as culturas foram tratadas com 2 acetato 25 mM por diferentes períodos de tempo antes da coleta do sobrenadante. As concentrações de TNF- α no sobrenadante foram aferidas por Elisa. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média.

Ainda em relação à expressão de TNF- α , foi questionado se o efeito observado seria uma característica específica da linhagem C8-B4 sem relação com a resposta observada em outras linhagens e na microglia primária. Para avaliar essa hipótese culturas de microglia primária de camundongo foram tratadas com acetato (0,05; 0,25 e 2,5 mM) e, em seguida, estimuladas com LPS 1 $\mu\text{g/ml}$. A expressão de TNF- α foi avaliada por citometria de fluxo 24 horas após o estímulo com LPS. As doses de 0,25 e 2,5 mM aumentaram a porcentagem de células expressando TNF- α de forma estatisticamente significativa (respectivamente

$p < 0,01$ e $p < 0,001$) (Figura 15). Esses resultados confirmam que o acetato estimula a produção de TNF- α induzida por LPS. Esses resultados também permitem concluir que a citoproteção mediada por acetato na microglia estimulada por LPS não ocorre através da inibição da expressão de TNF- α .

Figure 15 - Efeito do acetato na produção de TNF- α por culturas primárias de microglia de camundongo. Culturas primárias de microglia de camundongo foram tratadas com diferentes doses de acetato e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 1 μ g/ml. As células foram mantidas com LPS por 24 horas, ao término desse período, foram coletadas, marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Em A são mostrados os gates do experimento, em B resultado na forma de gráfico. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média, n = 3 por grupo.

5.8 EFEITO DO ACETATO NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO

Uma característica marcante das linhagem C8-B4 é sua grande capacidade de secreção de glutamato que ocorre tanto espontaneamente, quanto em resposta

a estímulos como LPS (117). Foi demonstrado que o estímulo com LPS associado ao IFN- γ reduz a viabilidade de culturas de microglia C8-B4 em função das grandes concentrações de glutamato no meio de cultura associado ao aumento de NO (118). Fagócitos mononucleares podem liberar glutamato em resposta à ativação por LPS, logo um efeito anti-inflamatório do acetato como observado na secreção de IL-6 poderia melhorar a viabilidade celular das culturas pela inibição da secreção de glutamato. As concentrações de glutamato no meio de cultura foram avaliadas por ensaio colorimétrico. As amostras de meio de cultura foram coletadas 48 horas após o estímulo com LPS. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos LPS e acetato + LPS ($p > 0,05$). No entanto, o controle “acetato” mostrou concentrações significativamente menores que o controle “meio/veículo” ($p < 0,001$) (Figura 16). Esses resultados mostram que o acetato pode inibir a secreção de glutamato em condições basais, mas não ocorre inibição quando as células são ativadas por LPS, portanto a melhora da viabilidade celular induzida por acetato não ocorre através da inibição da secreção de glutamato.

Figura 16 - Secreção de Glutamato por culturas de microglia tratadas com LPS e acetato. Culturas de Microglia (C8-B4) foram tratadas com acetato e, após 60 min, estimuladas com LPS 0,25 μg/ml. As células foram mantidas em meio com acetato e LPS por 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi coletado e a quantidade de glutamato aferida por ensaio colorimétrico. Análise estatística: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. As barras representam média ± Desvio padrão da média (n = 6 culturas por grupo).

5.9 EPIGENÉTICA COMO MECANISMO DE AÇÃO DO ACETATO

Os resultados acima mostraram que o efeito citoprotetor do acetato não está relacionado com inibição da inflamação que, em outros estudos foi associado à ativação do receptor GPR43 (21). No entanto, os AGCC também podem agir de forma epigenética como inibidores de HDAC estimulando a atividade de HAT. Para avaliar um possível efeito epigenético do acetato, as culturas de microglia foram tratadas com tricotatina, um de HDACs (119). O tratamento com tricotatina foi efetivo em mimetizar o efeito citoprotetor do acetato em ensaios de viabilidade

celular por azul de trypan (p<0,05, grupo LPS em comparação ao grupo tricostatina + LPS) (Figura 17 B e C), MTT e LDH (em ambos os casos p>0,05 na comparação entre os grupos acetato + LPS e tricostatina + LPS) (Figura 18). Também foi avaliado o efeito da tricostatina na secreção de TNF- α pela microglia. O tratamento com tricostatina 1 ng/ml foi efetivo em aumentar a secreção de TNF- α induzida por LPS (p<0,001, grupo LPS em relação ao grupo tricostatina + LPS) ainda que o fenômeno não tenha ocorrido na mesma magnitude observada com acetato (p<0,001, grupo LPS em relação ao grupo acetato + LPS) (Figura 19). O fato de a tricostatina, um inibidor específico de HDACs, induzir efeitos semelhantes ao acetato tanto em relação à secreção de TNF- α quanto em relação à preservação da viabilidade celular, sugere que o efeito do acetato também pode ser mediado por via epigenética, ou seja, pela inibição das HDACs.

Figure 17 - Viabilidade celular por Azul de tripan. Culturas de Microglia (C8-B4) foram tratadas com Tricostatina A e, após 60 min, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. As células foram mantidas em meio com LPS por 48 horas, em seguida foram coletadas e mercadas com azul de tripan, transferidas para câmara de Neubauer e contadas em microscópio óptico. Em A fotos representativas de cada grupo. Em B número total de células viáveis em cada grupo. Em C percentagem de células viáveis em relação ao total. Análise estatística: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. As barras representam média ± Desvio padrão da média (n = 3 culturas por grupo).

Figure 18 - Viabilidade de microglias C8-B4 tratadas com tricostatina e LPS. Culturas de Microglia (C8-B4) foram tratadas com Tricostatina A e, após 60 min, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. As células foram mantidas em meio com LPS por 48 horas. Após esse período, a viabilidade celular foi aferida por técnica de MTT e a quantidade de LDH aferida no meio de cultura. Análise estatística: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. As barras representam média ± Desvio padrão da média (n = 3 culturas por grupo).

Figura 19 - Efeito da tricostatina na produção TNF- α por células da microglia. Culturas de microglia foram tratadas com acetato ou tricostatina e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 μ g/ml. O sobrenadante foi coletado 48 horas após estímulo com LPS e as concentrações de TNF- α aferidas pelo método de Elisa. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média, n = 5 por grupo.

Com o objetivo de melhor avaliar a hipótese de um mecanismo epigenético para a ação do acetato, a produção de TNF- α e a viabilidade celular foram novamente avaliados em culturas de microglia tratadas com acetato e tricostatina, porém nesses experimentos foi incluído um novo grupo com tratamento simultâneo com acetato e tricostatina. Na comparação com os grupos acetato + LPS e tricostatina + LPS o grupo acetato + tricostatina + LPS mostrou diminuição da produção de TNF- α em relação ao grupo acetato + LPS ($p < 0,001$) e aumento em relação ao grupo tricostatina + LPS ($p < 0,001$) (Figura 20). O fato de não ocorrer somatória de efeitos quando acetato e tricostatina são usados em associação sugere que ambos competem pelo mesmo sítio de ação. Resultados semelhantes foram obtidos quando o mesmo protocolo de tratamento foi repetido e a viabilidade celular foi aferida por técnica de MTT. Houve aumento significativo da

viabilidade celular na comparação entre os grupos tricostatina + LPS e acetato + tricostatina + LPS ($p < 0,01$), no entanto não houve diferenças estatísticas entre o grupo acetato + LPS e acetato + tricostatina + LPS ($p > 0,05$) (Figura 20). Esses resultados sugerem que, também em relação a viabilidade celular, acetato e tricostatina competem pelo mesmo sítio de ação.

Figura 20 - Efeito do tratamento simultâneo com acetato e tricostatina em culturas de microglia estimuladas com LPS. Culturas de microglia foram tratadas com acetato e/ou tricostatina e, em seguida, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. O acetato foi administrado 90 minutos antes do LPS e a tricostatina foi administrada 60 minutos antes. Após 48 horas de estímulo com LPS o sobrenadante foi coletado e as concentrações de TNF- α aferidas pelo método de Elisa. Em outro experimento o mesmo protocolo de tratamento foi utilizado e, após as 48 horas de estímulo com LPS, a viabilidade celular foi aferida pela técnica de MTT. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média. N = 4 por grupo no experimento de dosagem de TNF- α e n = 8 por grupo no experimento de viabilidade celular. No experimento de viabilidade celular os grupos: acetato + LPS, Tricostatina + LPS e Acetato + tricostatina + LPS apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo LPS, respectivamente: $p < 0,0001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$.

A capacidade dos AGCC de inibir as HDAC já foi amplamente estudada, principalmente em relação ao butirato (44). Entretanto, os estudos não deixam claro se o acetato tem a capacidade de inibir essas enzimas (45, 46). Diante da incongruência entre os dados da literatura e a semelhança entre efeitos do acetato e da tricostatina foram formuladas duas hipóteses: o acetato poderia inibir a HDAC

em função da dose utilizada ser muito alta ou, o efeito epigenético ocorreria pelo estímulo a atividade de HAT uma vez que o acetato é substrato para a atividade dessas enzimas (120, 121). Essas hipóteses foram avaliadas pela medida da atividade de HDAC e HAT que foi aferida por ensaios colorimétricos. O tratamento com acetato não foi efetivo em alterar a atividade de HDAC, porém, em relação a atividade de HAT, o grupo acetato + LPS mostrou atividade de HAT semelhante aos valores basais enquanto que no grupo LPS houve redução da atividade de HAT ($p < 0,05$) (Figura 21). Esses resultados sugerem que tanto o efeito citoprotetor quanto o efeito de estímulo a expressão de TNF- α induzidos por acetato ocorrem por mecanismo epigenético mediado pela HAT.

Figura 21 - Atividade de HDAC e HAT em culturas de microglia tratadas com LPS e acetato. Culturas de Microglia (C8-B4) foram tratadas com acetato e, após 60 min, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. As células foram mantidas em meio com acetato e LPS por 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as células coletadas para extração de lisado de celular. A atividade de HDAC e HAT no lisado celular foi aferida por ensaios colorimétricos. Análise estatística: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média ($n = 3$ culturas por grupo).

5.10 ACETATO INDUZ AUTOFAGIA POR VIA EPIGENÉTICA

A epigenética está relacionada à expressão gênica. Mecanismos epigenéticos podem, portanto, acentuar ou inibir a expressão de alguns genes ou grupos de genes (35-37). Logo, as ações epigenéticas do acetato devem influenciar outros processos celulares de forma a melhorar a viabilidade celular. Nesse contexto, a autofagia tem sido apontada como mecanismo citoprotetor em diversos modelos de dano celular, por exemplo, proteção de células tumorais da apoptose induzida por quimioterápicos (122-124), lesão por isquemia-reperfusão de células do miocárdio (125), etc. Inibidores de HDAC como tricostatina e SAHA tem a capacidade de induzir autofagia em diferentes tipos de células (119). Com base nos dados da literatura e nas semelhanças encontradas entre os efeitos do acetato e da tricostatina, formulamos a hipótese de que o efeito citoprotetor observado na microglia é resultado da indução de autofagia pelo acetato.

Para avaliar se o acetato pode induzir autofagia em células C8-B4 ativadas por LPS o protocolo de tratamento foi repetido, e lisado celular foi coletado para análise da expressão da proteína p62. A indução de autofagia foi inversamente associada a expressão dessa proteína. Os níveis de p62 foram avaliados por western blot 12, 24 e 48 horas após o estímulo com LPS. Houve clara redução da expressão de p62 nos 3 tempos testados nas células tratadas com acetato (Figura 22). Nos grupos estimulados com LPS, houve redução da expressão da p62 no grupo acetato + LPS em relação ao grupo LPS, mas a redução foi observada apenas no tempo de 48 horas (Figura 22). Tanto o grupo LPS quanto o grupo Acetato +

LPS mostraram concentrações mais elevadas de p62 que os grupos controle e acetato.

Durante a indução da autofagia, os autofagossomos se fundem aos lisossomos formando os autofagossomos com material citoplasmático em meio ácido. Logo, a indução da autofagia está relacionada a aumento do número de lisossomos/autolisossomos no citoplasma o que pode ser mensurado através do uso de marcadores de compartimentos ácidos. Com esse objetivo, as culturas foram tratadas com lisotracker ® e o número de lisossomos por células avaliado após 24 horas. Houve aumento do número de lisossomos/autolisossomos no grupo acetato em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) e no grupo acetato + LPS em relação ao grupo LPS ($p < 0,001$) (Figura 23). Esses resultados sugerem que o tratamento com acetato induz autofagia nas células da microglia.

Figura 22 - Efeito do acetato na expressão da proteína p62 por células da microglia. Culturas de microglia foram tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. As células foram mantidas com LPS por diferentes períodos de tempo (12, 24 e 48 horas). Ao término do tratamento, o meio de cultura foi desprezado, as células lavadas com PBS e lisadas com tampão RIPA. As proteínas no lisado foram quantificadas pelo método de Pierce. A quantificação da proteína p62 foi realizada por método de *western blot*, foram utilizados 30 µg de proteína por amostra.

Se a autofagia é o mecanismo responsável pela melhora da viabilidade celular, então o bloqueio farmacológico da autofagia deve reverter o efeito do acetato na viabilidade celular. Nesse contexto, as culturas de microglia foram pre-tratadas com cloroquina, 1 hora antes de receberem acetato e a viabilidade celular avaliada pelo método de MTT e pela dosagem de LDH. Na aferição da viabilidade celular por MTT, o pré-tratamento com cloroquina reverteu a citoproteção induzida por acetato praticamente aos níveis do grupo LPS ($p < 0,01$, LPS em relação ao grupo Acetato + LPS e $p < 0,05$ acetato + LPS em relação ao grupo CQ + Acetato + LPS) (figura 24). A dosagem de LDH no meio de cultura também mostrou reversão dos efeitos do acetato quando do pré-tratamento com cloroquina. O grupo CQ+Acetato+LPS mostrou níveis de LDH semelhantes aos do grupo LPS ($p > 0,05$). Tanto o grupo LPS quanto o grupo CQ+acetato+LPS mostraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo Acetato+LPS (respectivamente $p < 0,01$ e $p < 0,001$) (Figura 24). As culturas tratadas apenas com cloroquina mostraram aumento dos níveis de LDH que foram estatisticamente significativos em relação ao grupo controle sugerindo aumento da taxa basal de morte celular nessas culturas. Em conjunto, os resultados desses dois experimentos (Figura 24) confirmam que o efeito citoprotetor do acetato é mediado pela indução de autofagia.

Até aqui, os resultados obtidos sugerem que o acetato induz autofagia na microglia C8-B4 por atuar de forma epigenética via inibição de HDAC e/ou estímulo à atividade de HAT. A autofagia é processo altamente regulado em vários

níveis, não existindo necessariamente relação entre a indução do processo e a transcrição dos genes das moléculas envolvidas na processo. No entanto, se o efeito do acetato ocorre ao nível epigenético, deve ocorrer aumento da transcrição gênica de alguns dos genes de autofagia. Para verificar a ação do acetato na transcrição gênica, a expressão de duas moléculas chave nesse processo (ATG5 e ATG12) foi quantificada por PCR em tempo real. O tratamento com acetato aumentou de forma estatisticamente significativa a expressão de ATG5 nos grupos acetato e acetato + LPS (Figura 25), comparando respectivamente com os grupos controle ($p < 0,05$) e LPS ($p < 0,05$). Em relação ao gene ATG12, houve alteração estatisticamente significativa somente na comparação entre os grupos LPS e acetato + LPS ($p < 0,001$) (Figura 25).

Figure 23 - Quantificação de lisossomos em células da microglia tratadas com acetato e estimuladas com LPS. Culturas de microglia (C8-B4) foram tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. As células foram mantidas com LPS por 24 horas e, ao término desse período, foram marcadas com reagente lisotracker® na concentração de 75 nM durante 60 minutos. Em seguida foram lavadas com PBS e fotografadas. O número de lisossomos por célula foi determinado através de análise no programa imagej. Em A são mostradas figuras representativas de cada grupo. Em B é mostrado o resultado da quantificação e a análise estatística. Análise estatística: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média (n, controle = 136 células, Acetato = 192 células, LPS = 143 células, Acetato + LPS = 105).

Figura 24 - Bloqueio da ação do acetato pela cloroquina. Culturas de microglia foram semeadas em placas de 96 poços, tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 μ g/ml. A cloroquina (CQ) 5 μ M foi administrada 2 horas antes do acetato. As células foram mantidas com LPS por 48 horas, ao término desse período, a viabilidade celular foi aferida pela técnica de MTT. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média, n = 8 por grupo. Em outro experimento, culturas de microglia foram semeadas em placas de 12 poços e os níveis de LDH dosados no meio de cultura 48 horas após o tratamento com LPS. O tratamento foi o mesmo descrito para o experimento com MTT. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média, n = 4 por grupo.

Figura 25 - Efeito do acetato na expressão de genes relacionados à autofagia. Culturas de microglia foram tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. As células foram mantidas com LPS por 48 horas, ao término desse período, o meio foi desprezado, os poços lavados com PBS e as células coletadas em trizol. A expressão dos genes testados foi realizada através da técnica de PCR em tempo real. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média ± Desvio padrão da média (n = 4 culturas por grupo).

5.11 ACETATO NÃO INTERFERE NA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL

Uma hipótese alternativa para explicar os efeitos do acetato no modelo testado seria uma ação direta nas mitocôndrias que reduziria a síntese de ATP que poderia induzir autofagia pela carência energética resultante. Foi demonstrado, por exemplo, que o propionato pode retardar a apoptose e melhorar a viabilidade celular através de efeito direto nas mitocôndrias com redução do potencial de membrana, redução de síntese de ATP e indução de mitofagia (111). Para verificar se existe efeito direto do acetato nas mitocôndrias semelhante ao descrito com

propionato, as culturas de microglia foram tratadas e avaliadas quanto à produção de íon superóxido que é alterada em situações de estresse mitocondrial. Após 48 horas, o tratameto com LPS alterou ligeiramente e de forma estatisticamente significativa a produção de íon superóxido na comparação com o grupo controle ($p < 0,01$). No entanto, o tratamento com acetato não alterou a produção de superóxido na comparação entre os grupos controle e acetato e os grupos LPS e acetato + LPS (Figura 26). Isso sugere que o acetato não interfere no funcionamento das mitocôndrias.

Figure 26 - Ensaio MitoSOX. Efeito do acetato na produção de superóxido. Culturas de microglia (C8-B4) foram tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. As células foram mantidas com LPS por 48 horas e, ao término desse período, foram marcadas com reagente mitoSOX®, coletadas e analisadas por citometria de fluxo. Em A histogramas representativos de cada um dos grupos. Em B os histogramas foram reunidos em um único gráfico (controle: linha preta, acetato: linha verde, LPS: linha vermelha, Acetato+LPS: linha azul). Em C mediana da intensidade de fluorescência de cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ Desvio padrão da média ($n = 3$ culturas por grupo).

Ainda com o intuito de avaliar possível efeito do acetato nas mitocôndrias, foi avaliada a expressão de genes relacionados a biogênese mitocondrial. Foram avaliados respectivamente MFN1, NRF1, CO1 e Nd1. Em relação ao gene Nd1, o tratamento com acetato reduziu a expressão gênica em relação ao controle ($p < 0,01$), mas não houve redução da expressão gênica na comparação entre os grupos LPS e acetato + LPS (Figura 27). Não houve alteração estatisticamente significativa em nenhum dos outros genes testados (Figura 27). Esses resultados sugerem que o tratamento com acetato não interfere na biogênese mitocondrial, portanto o efeito observado na viabilidade celular e indução de autofagia resulta, exclusivamente, do efeito epigenético sem participação de um efeito alternativo nas mitocôndrias.

Figure 27 - Efeito do acetato na biogênese mitocondrial. Culturas de microglia C8-B4 foram tratadas com acetato 25 mM e, após 60 minutos, estimuladas com LPS 0,25 µg/ml. Após 48 horas do estímulo com LPS, as células foram coletadas em trizol. A expressão gênica das moléculas Mitofusina 1 (Mfn1), fator respiratório nuclear 1 (Nrf1), Citocromo C Oxidase (CO1), NADH- ubiquinona oxiredutase cadeia 1 (ND1) foi avaliada por PCR em tempo real. As barras representam média ± Desvio padrão da média. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. As barras representam média ± Desvio padrão da média (n = 4 por grupo).

6 DISCUSSÃO

Há décadas que dietas ricas em fibras são associadas à vida saudável. Estudos clínicos mostraram que a ingestão de alimentos ricos em fibras reduz o risco de desenvolvimento de câncer de cólon, melhora o ritmo intestinal, reduz os níveis de colesterol LDL e o risco de morte cardiovascular (126-128). No entanto, os benefícios relacionados à ingestão de fibras parecem ir muito além da descrição clássica. Recentemente estudo com mais de 500.000 voluntários entre 50 e 71 anos mostrou relação inversa entre o consumo de fibras e o risco de morte por doenças respiratórias e por infecções (129). Em mulheres grávidas, a ingestão de fibras reduz a incidência de pré-eclâmpsia (130).

Não bastassem os efeitos diretamente ligados à prevenção de doenças, as dietas ricas em fibras podem ainda melhorar a saúde dos que já são saudáveis, pois melhoram o humor, cognição e o estado de alerta (131, 132).

Apesar de demonstrarem os inúmeros efeitos benéficos das fibras para saúde humana, os estudos clínicos deixaram em aberto os mecanismos responsáveis por esses efeitos. Argumentava-se que as fibras dificultavam a digestão e absorção de macronutrientes potencialmente danosos à saúde. Também se especulava que o melhor funcionamento intestinal acelerava o trânsito intestinal, dessa forma reduzindo o tempo de contato de potenciais carcinógenos com os intestinos (133). Nenhum desses estudos trouxe explicações consistentes que pudessem esclarecer efeitos tão relevantes ainda mais se levarmos em

consideração os estudos mais recentes. Como explicar a redução do risco de pré-eclâmpsia, uma doença autoimune (130). Como relacionar a ingestão de fibras com menor risco de morte por infecção (129), e, ainda mais complicado, como relacionar a dieta com o estado de humor e a cognição (131, 132). A descoberta dos AGCC e de sua importância na fisiologia dos mamíferos estabelece um elo entre os resultados dos estudos clínicos e os mecanismos fisiológicos subjacentes. O entendimento desses mecanismos, por sua vez, permite que novas hipóteses sejam formuladas expandindo nosso conhecimento sobre o impacto de nossos hábitos alimentares em nossa saúde. Dessa forma podemos inferir que aquilo que comemos pode ter efeitos cujo alcance vai muito além do trato alimentar.

Um aspecto interessante onde estudos clínicos e experimentais “casam” perfeitamente é a relação entre câncer de cólon e a ingestão de fibras. Os estudos clínicos mostram relação inversa entre ingestão de fibra alimentar e incidência de câncer de cólon (134). Os estudos experimentais, por sua vez, mostram que AGCC derivados da fermentação dessas fibras apresentam efeitos pró-apoptóticos e antiproliferativos que são especialmente relevantes em linhagens com alta taxa de proliferação e com transformações cancerígenas (65).

O objetivo inicial desse projeto era de estudar efeitos anti-inflamatórios dos AGCC, porém de forma acidental observamos fenômeno oposto ao esperado pelas informações da literatura. Era esperado que o acetato alterasse parâmetros inflamatórios das células microgliais frente à ativação do TLR4 pelo LPS. Quando a concentração de 25 mM foi testada esperava-se que induzisse importante efeito anti-inflamatório com possível efeito pró-apoptótico associado.

Surpreendentemente, a dose testada mostrou efeito inverso com clara diferença de viabilidade celular entre os grupos que receberam acetato e LPS em relação aos tratados apenas com LPS. O resultado foi percebido por observação direta ao microscópio óptico e ficou evidente quando o tempo de tratamento utilizado foi de 48 horas. Em experimentos de 24 horas, as diferenças, se existiam, não eram suficientemente claras para serem percebidas por mera observação.

O fenômeno de citoproteção induzido pela concentração de 25 mM de acetato foi estudado em experimentos de viabilidade celular por 7AAD. O tratamento com acetato reduziu as percentagens de células marcadas com 7AAD para níveis próximos aos do controle. Doses de 2,5; 25 e 50 mM foram efetivas tanto quando mantidas durante todo o tempo de estímulo quanto quando usadas em pré-tratamento (Figuras 6, 8 e 9). Entretanto esses resultados poderiam refletir apenas um efeito antiproliferativo do acetato como já demonstrado para AGCC em várias linhagens celulares. Essa hipótese foi avaliada em experimentos de proliferação celular em células marcadas com CFSE que mostraram que, de fato, o acetato apresenta relevante ação antiproliferativa na concentração de 50 mM, mínimo efeito na concentração de 25 mM e nenhuma ação na concentração de 2,5 mM (Figura 4). A ação antiproliferativa da dose de 50 mM chama atenção para importância do acetato na prevenção de câncer de cólon visto que esse composto pode ser encontrado em concentrações de 60 mM nos cólons (4), porém o estudo das possíveis propriedades antitumorais do acetato foge dos objetivos desse trabalho. O efeito antiproliferativo do acetato na concentração de 25 mM foi discreto, é necessário levar em consideração ainda o fato de que as células foram

tratadas por 96 horas nos experimentos com CFSE enquanto que os experimentos de viabilidade celular por 7AAD duravam a metade desse tempo o que torna o efeito antiproliferativo ainda menos relevante. De fato, quando a viabilidade celular, e, indiretamente, a proliferação celular, foi aferida pela técnica de MTT com tempo de tratamento de 48 horas, nenhum efeito proliferativo foi observado com a concentração de 25 mM (Figura 3) enquanto que os tratamentos com 2,5 e 50 mM mostraram efeitos opostos (Figura 3). Esses resultados levaram a escolha da concentração de 25 mM como ideal para o trabalho. Ainda assim, em alguns experimentos (Figuras 18 e 20) ficou evidente uma diferença entre o grupo controle e o grupo acetato 25 mM (sem LPS). Isso sugere que o tratamento de 25 mM por 48 horas está, na verdade, em valor limítrofe entre efeito proliferativo significativo e ausência deste efeito. O efeito antiproliferativo poderia reduzir o número de células marcadas com 7AAD porque cada cultura apresenta uma taxa basal de morte celular que pode aumentar se a placa apresentar maior densidade de células. Ao reduzir a quantidade de células na placa, o acetato poderia reduzir também a taxa de morte celular na cultura e assim induzir falso resultado na aferição por 7AAD.

Para eliminar as dúvidas deixadas pelos experimentos de viabilidade celular por 7AAD, o mesmo protocolo de tratamento foi usado em experimentos onde a viabilidade celular foi aferida pela técnica de MTT. Os resultados foram reproduzidos de forma consistente. Essa técnica é amplamente usada na aferição de viabilidade celular e, em relação ao 7AAD, tem a vantagem de ser utilizada em células aderidas. A microglia tem boa aderência à placa de cultura, logo, em

experimentos que usam 7AAD e aferição dos resultados por citometria, é necessário coletar as células mecanicamente ou com uso de tripsina produzindo uma população de células mortas que podem reduzir a sensibilidade do experimento e gerar um viés se o número de células mortas não for uniforme entre os grupos. A técnica de MTT elimina esses fatores de erro. Os resultados obtidos com MTT corroboram os obtidos com 7AAD.

Apesar de sua ampla aceitação, a aferição da viabilidade celular por MTT também tem suas falhas. O princípio do teste é a conversão do MTT em cristais de formazam. Foi demonstrado que as enzimas necessárias nesse processo são mitocondriais e a velocidade de clivagem do MTT em formazam é maior em células com maior atividade mitocondrial, o que fez surgir a crítica de que o MTT seria, na verdade, uma forma de avaliação da atividade mitocondrial (135) e não um método infalível para viabilidade celular. Se considerarmos em conjunto os resultados obtidos com 7AAD e MTT, não há motivos para acreditar que o acetato apenas altere a função mitocondrial sem alterar a viabilidade celular, pois o ensaio com 7AAD não é alterado pela atividade mitocondrial. Além disso, a viabilidade celular foi avaliada por outras duas técnicas, LDH e ensaio de ciclo celular (Figuras 7 e 18). A técnica de LDH avalia a taxa de morte celular nas culturas através da mensuração da quantidade de enzima LDH no sobrenadante. A LDH é liberada no meio de cultura quando as células morrem (136), portanto a viabilidade da cultura é avaliada de forma mais direta sem a interferência da atividade mitocondrial. Logo a combinação dessas diferentes técnicas permite concluir com segurança que o acetato melhora a viabilidade das culturas por reduzir a taxa de morte celular

nas culturas tratadas com LPS. Por outro lado, esses resultados levam a hipótese de que o efeito citoprotetor do acetato esteja de alguma forma ligada às mitocôndrias.

É importante comentar o resultado do experimento de ciclo celular (Figura 7). Na literatura, os AGCC são descritos como substâncias com ação antiproliferativa cujo efeito é parar o ciclo celular na fase “G1” (137). Os resultados mostraram, consistentemente, o oposto. O acetato diminuiu a porcentagem de células na fase G0/G1 e aumentou as porcentagens de células nas fases “S” e “G2/M”. Isso pode ser interpretado como efeito pró-proliferativo o que contraria os resultados com MTT e CFSE. No entanto, é importante considerar que os resultados dos experimentos de CFSE e MTT refletem o que ocorreu durante todo o tempo do experimento, enquanto o experimento de ciclo celular reflete, nos seus resultados, o que ocorre em um momento específico da evolução da cultura. No experimento, as células foram coletadas após 48 horas. Nesse momento as culturas do grupo controle já apresentaram importante crescimento e as placas aproximam-se da confluência. No caso das culturas do grupo acetato, se houver um discreto efeito antiproliferativo, o nível de confluência pode ser ligeiramente menor, permitindo às células manter níveis de proliferação maiores que os do grupo controle até o momento da confluência. Em relação aos grupos LPS e acetato + LPS, a explicação deve ser outra. Após 48 horas de estímulo com LPS, as culturas do grupo LPS devem apresentar baixas taxas de proliferação simplesmente porque a maior parte das células está, na verdade, em apoptose. Logo, não surpreende que, na comparação com o grupo acetato + LPS onde há maior taxa de viabilidade

celular, tenham menor taxa de proliferação, isto é, menor taxa de células nas fases “S” e “G2/M”. Além disso é preciso considerar que esse ensaio é desenhado para avaliar primariamente o ciclo celular pela aferiação da quantidade de DNA nas células, podendo-se, secundariamente, inferir efeito na proliferação a partir da interpretação do ciclo. Esse ensaio é, portanto, menos apropriado para avaliação da proliferação que o ensaio de CFSE.

A ativação dos receptores acoplados à proteína G, GPR41 e 43, foi apontada em vários estudos como parte importante dos efeitos dos AGCC. O receptor GPR43 é expresso principalmente em células do sistema imune enquanto o GPR41 é expresso em ampla gama de tecidos e células (19). Maslowski et al. mostraram que animais com deficiência do receptor GPR43 (GPR43^{-/-}) apresentam parâmetros inflamatórios exacerbados em modelos de colite, artrite e inflamação de vias aéreas que ocorre em parte pela maior produção de mediadores inflamatórios e maior recrutamento de células para sítios de processos inflamatórios. Nesse mesmo estudo, os autores utilizaram animais tipo selvagem e demonstraram redução de vários parâmetros inflamatórios quando os animais foram tratados com acetato. Em experimentos *in vitro* os autores avaliaram os níveis de apoptose em neutrófilos GPR43^{-/-} e tipo selvagem e mostraram que o acetato perdia o efeito quando utilizado na dose de 10 mM em animais GPR43^{-/-}, porém, surpreendentemente, a dose de 30 mM mantinha-se eficaz mesmo nos animais deficientes ainda que o efeito não fosse tão proeminente quanto o observado em animais tipo selvagem. Neste caso o acetato aumentou a apoptose de neutrófilos (21). As evidências da ativação dos receptores GPR pelo acetato levaram à hipótese

de que o efeito protetor observado na microglia fosse resultado da ativação desses receptores. A avaliação por PCR em tempo real revelou que a linhagem de microglia utilizada, C8-B4, expressa o receptor GPR43 e tem mínima expressão de GPR41 (Figura 5). Para avaliar a participação do receptor no processo, foi utilizada toxina pertussis (PTX) que bloqueia a proteína $G\alpha$ inibitória ($G\alpha i$) responsável pela sinalização intracelular desses receptores (20). O bloqueio da proteína $G\alpha i$ não reverteu os efeitos do acetato nos experimentos com 7AAD nem nos experimentos de MTT. Pode-se concluir, portanto, que a preservação da viabilidade celular mediada por acetato não ocorre via ativação dos receptores GPR41 e/ou 43.

O transporte de AGCC para o meio intracelular é mediado por transportadores de monocarboxilatos (MCT, do inglês *monocarboxylate transporter*) (138). No SNC, o MCT1 é encontrado principalmente na barreira hemato-encefálica e, em baixa expressão, nos astrócitos que também expressam o MCT4 enquanto o MCT2 é expresso por neurônios (138). Microglia em cultura expressa MCT1 e 2 e aumenta sua expressão quando ativada por $TNF-\alpha$. Em modelo de isquemia cerebral, microglia e macrófagos perilesionais mostram importante expressão de MCT1 e 2 (139). Podemos especular que diferentes padrões de expressão de transportadores podem explicar a melhor responsividade de determinado tipo de célula em relação a diferentes AGCC. Faz sentido que células epiteliais dos cólons apresentem grande capacidade de transporte de butirato e outros AGCC que são abundantes nos cólons, porém, em outros órgãos pode haver especificidade de cada tipo de célula para um ou mais compostos. No SNC estudos com acetato marcado mostram tendência de captação do acetato por

astrócitos onde é metabolizado em glutamato, GABA, aspartato e principalmente glutamina (140).

Nossos resultados e os de Soliman et al. mostram que também a microglia é capaz de captar o acetato e provavelmente também outros AGCC (48). Isso leva à inevitável hipótese de que o efeito do acetato observado em nossos experimentos seja resultado da utilização do acetato como fonte alternativa de energia. A linhagem utilizada, C8-B4, é de rápido crescimento e, nos experimentos realizados, foi mantida sob o efeito do LPS por 48 horas. Deve-se especular que a microglia estimulada com LPS aumentou seu consumo metabólico levando ao maior consumo do meio o que poderia justificar os menores níveis de viabilidade celular nos grupos tratados com LPS em relação aos grupos controle onde ocorreu apenas troca de meio de cultura. No entanto, o efeito citoprotetor do acetato foi reproduzido quando as culturas foram pré-tratadas com acetato por 2 horas, lavadas com meio e só então estimuladas com LPS, ou seja, mesmo com o acetato ausente durante as 48 horas de estímulo com LPS, o resultado é reproduzido. Pode-se concluir, portanto, que o efeito citoprotetor observado nos experimentos com a microglia não foi consequência da utilização do acetato como fonte alternativa de energia pelas células. Esses resultados sugerem que o efeito protetor do acetato ocorre por mecanismo que se mantém ativo mesmo após a retirada do acetato do meio. Corroborando essa hipótese, o tratamento com cloroquina reverteu os efeitos do acetato (Figura 24). Isso não ocorreria se o acetato fosse diretamente utilizado como fonte de energia.

Até o momento a literatura científica especifica quatro diferentes mecanismos de ação para os AGCC: fonte alternativa de energia, ativação de GPR41 e 43 associados a proteína G α i (20, 21), ativação do receptor Olfr78 (32) e alterações epigenéticas induzidas via HDACs ou HATs (45, 46). Provavelmente existem outros mecanismos que ainda serão descobertos. Nossos resultados permitem descartar a ativação dos GPRs e a hipótese de fonte alternativa de energia como mecanismos subjacentes ao fenômeno e mostram evidências de que o efeito ocorre via alterações do controle epigenético. Então devemos questionar como essas alterações epigenéticas protegem a microglia frente à ativação pelo LPS. Nossa primeira hipótese foi de que o tratamento poderia reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio ou de NO. Essa hipótese foi avaliada por teste de Griess que avalia a concentração de nitritos no meio de cultura e pela técnica de dosagem de NO intracelular por marcação via DAF-FM. O teste de Griess realizado 48 horas após o início do estímulo com LPS mostrou que o tratamento com acetato não reduziu as concentrações de NO no meio de cultura. A dosagem de NO intracelular 24 horas após o LPS também não mostrou diferenças dos grupos tratados com acetato 2,5; 12,5 e 25 mM em relação ao tratamento apenas com LPS. Portanto, o tratamento com acetato não reduz a produção de NO induzida por LPS. Conclui-se que a melhora da viabilidade celular não ocorre pela redução do efeito tóxico do NO na microglia.

É interessante comparar nossos resultados de dosagens de NO com os da literatura. Kim et al. estudaram o efeito do butirato de sódio na microglia estimulada com LPS (20 μ g/ml) e INF- γ (20 U/ml). O butirato (1 mM)

administrado 30 minutos antes do estímulo inflamatório reduziu a produção de NO induzida por IFN- γ , mas não mostrou nenhum efeito na produção induzida pelo LPS 24 e 48 horas após o estímulo. Houve ainda redução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Nossos resultados corroboram, portanto, os da literatura embora os AGCC testados sejam diferentes. Esses mesmos autores avaliaram o efeito do butirato na viabilidade celular da microglia estimulada por IFN- γ (20 U/ml) por 48 horas. O IFN- γ reduziu a viabilidade celular da microglia, efeito que foi quase completamente revertido pelo butirato (1 mM). Os autores comentaram o fato de o butirato ter aumentado a viabilidade celular quando o resultado esperado seria a indução de apoptose e atribuíram a melhora à redução da produção de NO. Houve ainda redução da expressão de TNF- α induzida por IFN- γ , mas não por LPS (59). Existem algumas diferenças importantes entre o trabalho de Kim et al. e o presente estudo que vão além do AGCC utilizado. A linhagem de microglia usada por esses autores foi a BV2, derivada de cérebro de camundongos, enquanto a linhagem utilizada em nossos experimentos foi a C8-B4 derivada de cerebelo de camundongos C57Bl/6 (117). O estímulo inflamatório usado no experimento de viabilidade celular foi o IFN- γ e o butirato foi eficiente em reduzir a produção de mediadores inflamatórios induzidos por esse estímulo. Houve redução da produção de NO que pode justificar a melhora da viabilidade celular. Nossos resultados, ao contrário, não mostram redução da produção de NO. Logo, fez-se necessário encontrar outro fator responsável pelo resultado.

Além de mostrarem redução da produção de NO, Kim et al. também demonstraram que o tratamento com butirato reduz a expressão de TNF- α

induzida por INF- γ (59). Com base nesses resultados formulamos uma nova hipótese de que a preservação da viabilidade celular ocorreu por redução da secreção de TNF- α . Essa hipótese foi avaliada inicialmente pela dosagem de TNF- α no meio de cultura por ensaio CBA. Surpreendentemente, o tratamento de acetato e LPS levou a aumento expressivo da secreção de TNF- α . Na literatura, de forma geral os AGCC são associados a efeito anti-inflamatório, porém, em alguns casos, esse efeito não é tão claro. Alguns estudos mostraram efeitos potencialmente pró-inflamatórios como, por exemplo, estímulo à quimiotaxia. Neutrófilos expostos a diferentes doses de acetato ou propionato apresentam melhor resposta quimiotática que atinge eficiência máxima com concentrações de aproximadamente 1 mM e que perdem efeito com concentrações mais elevadas (20). Outros autores mostraram efeitos semelhantes com doses menores (0,1 mM) de propionato e butirato também com perda de efeito nas doses mais elevadas (5 mM). Nesse estudo os autores isolaram neutrófilos de lavado peritoneal induzido por tioglicolato em camundongos tipo selvagem e GPR43 $-/-$. O incremento à quimiotaxia ocorreu apenas nos animais tipo selvagem. No mesmo estudo os autores investigaram parâmetros inflamatórios em animais tipo selvagens e GPR43 $-/-$ com colite crônica induzida por sulfato sódico de dextrano. Ao contrário do que foi demonstrado em outro estudo com animais GPR43 $-/-$ (21), os animais deficientes de GPR43 apresentavam parâmetros inflamatórios atenuados em relação aos controles. Os animais tipo selvagem apresentavam maior pontuação de doença, maior infiltrado de polimorfonucleares, maior atividade de mieloperoxidase e, mais importante, maior produção de TNF- α (57). Portanto, nem sempre a ativação do GPR43 tem efeito anti-inflamatório, dependendo do contexto,

animais GPR43 -/- podem ter parâmetros inflamatórios atenuados em relação aos animais tipo selvagens. Os resultados de Maslowski et al. e Sina et al. são completamente discordantes à primeira vista, porém os primeiros usaram modelo agudo de colite por dextran (DSS) enquanto os últimos usaram modelo crônico (21, 57). Aparentemente dentro de um contexto diferente a ativação do receptor GPR43 pode ter ações também diferentes. Esses estudos focaram seus experimentos em neutrófilos, não é adequado compará-los diretamente com nossos resultados obtidos em linhagem mononuclear, porém sugerem a hipótese de que o aumento de TNF- α observado em nossos resultados seja mediado pela ativação do receptor GPR43.

Em relação à microglia, Huuskonen et al. estudaram o efeito do butirato em microglia primária de rato ativada por LPS (5 μ g/ml). O regime de tratamento foi semelhante ao deste estudo com pré-tratamento de 22 horas seguido por lavagem e ativação com LPS ou tratamento simultâneo por 24 horas. Semelhante aos nossos resultados, o pré-tratamento reduziu a expressão de NO, IL-6 e TNF- α , enquanto o tratamento simultâneo reduziu apenas a expressão de IL-6, com aumento da produção de NO e aumento, sem significância estatística de TNF- α (58). Os autores não verificaram os mecanismos responsáveis pelas diferenças de resultados encontradas entre os dois regimes de tratamento. É interessante comparar nossos resultados com os desses autores. Em ambos os casos o tratamento com AGCC resultou em diminuição da expressão de IL-6 (Figuras 12 e 13). Em relação ao TNF- α , os dois trabalhos mostram aumento quando o AGCC e o LPS foram mantidos simultaneamente na cultura (58). No caso de Huuskonen et al. esse

aumento não foi estatisticamente significativo. Em nossos experimentos, o acetato induziu aumento significativo em todos os tempos testados e de forma dose dependente (Figuras 12, 13 e 14). Os resultados de Huuskonen et al. sugerem que o efeito anti-inflamatório prevalece quando há pré-tratamento e se modifica para padrão mais pró-inflamatório quando do tratamento simultâneo.

Ainda é preciso correlacionar os resultados da expressão de TNF- α com a melhora da viabilidade celular. Kim et al. mostraram que culturas de microglia estimuladas por IFN- γ (20 U/ml) durante 48 horas evoluem com diminuição importante da viabilidade celular. Efeito que é corrigido quase na sua totalidade pelo tratamento por butirato (1 mM) iniciado 1 horas antes do INF- γ e mantido no meio de cultura durante todo período de estímulo (59). Esses autores atribuíram a melhora da viabilidade celular à redução da produção de NO e demonstraram ainda redução da expressão de TNF- α que, por ativar receptores de morte celular, também podem ajudar a explicar o resultado. Nossos resultados, ao contrário, não mostram redução da produção de NO e ainda evidenciam aumento importante de TNF- α . Conclui-se que o TNF- α não explica o fenômeno observado. Aqui também podemos especular que a justificativa dos autores para o fenômeno pode ser apenas um epifenômeno, pois, em nenhum momento, esses autores fazem experimentos que estabeleçam de forma clara uma relação causa-efeito entre o tratamento com butirato e a melhora da viabilidade celular. Nossos resultados mostram que a melhora ocorre apesar de mantidos os níveis de produção de NO e apesar do aumento de TNF- α . Não necessariamente o mecanismo tem que ser o mesmo nos dois trabalhos, pois LPS e IFN- γ ativam vias intracelulares diferentes

(141), porém as semelhanças dos nossos resultados com os desses autores e a discordância com o restante da literatura chamam atenção para a possibilidade de um mecanismo em comum.

O resultado observado em relação ao TNF- α levanta ainda duas questões: essa resposta poderia ser uma idiossincrasia da linhagem de microglia utilizada (C8-B4) ou decorrente da alta concentração de acetato usado no tratamento. As concentrações séricas de acetato em seres humanos foram relatadas em aproximadamente 100 a 150 μ M podendo aumentar até 10 vezes após consumo de etanol (70). O tratamento utilizado nas culturas (25 mM) encontra-se muito acima desses valores. Concentrações mais baixas poderiam induzir respostas diferentes das observadas nos experimentos como os observados na quimiotaxia de neutrófilos (20, 57). No entanto, o tratamento de culturas primárias de microglia de camundongo com doses mais baixas de acetato mostraram resultados semelhantes aos observados na linhagem C8-B4. Houve aumento de células positivas para TNF- α com doses de 0,25 e 2,5 mM de acetato, apenas a dose de 0,05 mM não foi efetiva (Figura 15). Por conseguinte, o resultado não é específico da linhagem e também ocorre em linhagens primárias tratadas com concentrações mais baixas de acetato.

Estudos que utilizaram outras linhagens de fagócitos mononucleares e outros tipos de estímulo mostram que as respostas aos AGCC podem ser bastante variáveis, por exemplo, o butirato reduz de forma dose dependente a expressão de TNF- α , IL-12, e aumenta a de IL-10 em monócitos humanos estimulados com estafilococos aureus. (50). Também foram demonstrados efeitos diferentes e, até

mesmo opostos, quando acetato (10 mM), butirato (1,5 mM) e propionato (2 mM) foram testados em linfócitos de rato ativados com concavalina A, a expressão de IFN- γ foi inibida pelo butirato e estimulada por acetato e propionato (52). Isso sugere que a resposta aos AGCC não é uniforme. Aparentemente, o butirato é mais anti-inflamatório enquanto acetato e propionato têm efeitos menos previsíveis. Os resultados da literatura, no entanto, não explicam a dicotomia dos nossos resultados em relação à produção de citocinas. Como explicar que o acetato simultaneamente estimula a produção de TNF- α e reduz a de IL-6. Duas citocinas pró-inflamatórias cuja expressão, nesse caso, foi mediada pela ativação de NF- κ B. A resposta a essa pergunta sugere que o mecanismo de ação do acetato nesse sistema não é um efeito “tradicional” como inibição do NF- κ B ou bloqueio do TLR4.

Ainda em relação à viabilidade celular das culturas, os resultados descartaram que tenha ocorrido por diminuição da secreção de NO ou TNF- α , porém existe outra possibilidade. A linhagem de microglia C8-B4 tem por característica a secreção de grandes quantidades de glutamato que ocorre espontaneamente e aumenta com a ativação por LPS (117). Em função disso, foi formulada a hipótese de que a melhora da viabilidade celular ocorreria pela redução da secreção de glutamato quando do tratamento com acetato. De fato, Xu et al. mostraram que a microglia ativada por IFN- γ + LPS evolui com perda importante da viabilidade celular em 24 horas e que esse resultado é decorrente da secreção de glutamato (118). Esses autores demonstraram também que o bloqueio à secreção de glutamato melhora a viabilidade celular das culturas (118). Nossos resultados não mostraram redução da concentração de glutamato nas

culturas tratadas com acetato após 48 horas de estímulo com LPS (Figura 16). Portanto, a melhora da viabilidade celular não ocorre por inibição da secreção de glutamato. É interessante observar que houve redução da secreção de glutamato na comparação entre o grupo controle e o grupo acetato. Estudos mostram que a astrogliia pode captar tanto acetato quanto glicose que, após serem convertidos em Acetil-CoA, entram no ciclo dos ácidos tricarboxílicos onde são convertidos em α -cetoglutarato. Esse, por sua vez, pode ser convertido em glutamato que pode ser convertido em glutamina (142). Logo, é possível que o acetato tenha alterado a secreção de glutamato em culturas que não foram ativadas por LPS por interferir no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. No entanto, estudo pormenorizado da secreção de glutamato por células da microglia foge dos objetivos desse trabalho.

Foram descritos diversos mecanismos de ação do acetato relacionados ao controle epigenético o que levou a hipótese de que as alterações observadas nos experimentos até o momento fossem resultado dessas ações. Para testar essa hipótese, a tricostatina A, um inibidor de HDAC de classe 1 e 2, foi utilizada em experimento de viabilidade celular por azul de tripan. A tricostatina na dose de 1 ng/ml reduziu a morte celular de microglia C8-B4 estimulada com LPS 0,25 μ g/ml por 48 horas (Figuras 17 e 18). Esses resultados mostram que um inibidor de HDAC é capaz de mimetizar os efeitos citoprotetores do acetato. Isso sugere que o mecanismo subjacente à preservação da viabilidade celular é a inibição da atividade de HDAC, porém não está claro se o acetato agiu por inibição direta da enzima, por inibição da sua expressão ou ainda por estímulo a função das HATs.

Os resultados mostram que o acetato pode modular a ativação da microglia, uma célula que, em princípio, permanece dentro do SNC durante toda a sua existência (73, 79). Outros AGCC, principalmente o butirato, também podem modular a ativação da microglia com efeitos que variam de acordo com a dose e o momento do tratamento (58, 59). Os mecanismos subjacentes aos efeitos dos AGCC foram, no entanto, pouco estudados nessas células. Especificamente em relação ao acetato, Soliman et al. demonstraram alterações epigenéticas que variam com o tipo de tratamento utilizado, agudo ou crônico, e correlacionaram os achados com os efeitos imunomodulatórios encontrados (45, 46, 48, 49). No entanto, em nenhum momento esses autores estabeleceram clara relação entre as alterações epigenéticas e os efeitos imunomodulatórios. Os experimentos mostram que os dois fenômenos ocorrem simultaneamente pela ação do acetato, mas não estabelecem relação causa efeito, ou seja, não fica demonstrado que a imunomodulação é consequência das alterações epigenéticas. A ausência de drogas capazes de bloquear os efeitos epigenéticos do acetato torna essa tarefa difícil. Entretanto, alguns estudos conseguem estabelecer relação causa efeito ao utilizar inibidores de HDACs. Se droga inibidora de HDAC consegue mimetizar os efeitos do AGCC utilizado, então se pode inferir que o efeito observado é consequência da inibição dessas enzimas pelo AGCC. Drogas tais como tricostatina A e SAHA foram utilizadas com essa finalidade (143). Ainda assim, é preciso considerar os demais mecanismos de ação dessas substâncias. Na literatura disponível até o momento nenhum estudo analisou o papel dos GPRs ou do receptor Olfr78 na imunomodulação mediada por AGCC em microglia. Nossos resultados mostram que o bloqueio de receptores GPR41 e/ou 43 pela toxina pertussis não reverteu a

morte celular induzida por LPS (Figuras 9 e 10). Por outro lado, a tricostatina A, um inibidor de HDAC de classe I e II, conseguiu mimetizar os efeitos do acetato reduzindo a morte celular induzida pelo LPS sem apresentar efeitos tóxicos na dose utilizada (Figuras 17 e 18). Isso sugere que o acetato diminuiu de alguma forma a atividade dessa enzima. Mais experimentos serão necessários para esclarecer os detalhes dessa ação, porém o uso da tricostatina sugere uma relação causa efeito entre o resultado obtido e o tratamento com acetato e torna remota a possibilidade de um epifenômeno.

O efeito do acetato nas HDAC é motivo de debate. O efeito deste e de outros AGCC foi estudado por Waldecker et al. em extratos nucleares de células HT-29 e em células Hela modificadas que expressam luciferase em resposta a inibição das HDAC. Entre os vários AGCC testados, o butirato foi o mais efetivo em inibir a atividade enzimática, a concentração de 2 mM foi suficiente para inibir completamente a atividade de HDACs. O butirato foi seguido por propionato e valerato em ordem de potência enquanto o acetato foi completamente ineficiente mesmo quando utilizado na dose de 20 mM (144). Soliman et al. ao contrário mostraram efeitos opostos em sistema *in vivo*. A suplementação com acetato ocorreu via administração oral de gliceril triacetato em dose única. O tratamento foi efetivo em inibir a atividade de HDAC em amostras de cérebro coletadas entre duas e 4 horas após o tratamento e em aumentar as taxas de acetilação de diferentes histonas entre 2 e 24 horas após o tratamento. Em outro experimento, esses autores demonstraram que o efeito ocorria não por inibição direta das HDAC, mas por redução da expressão de HDAC 2 (classe I) (45). Mais especificamente em

relação à microglia, Soliman et al. também demonstraram que acetato na dose de 12 mM por períodos de 2 a 4 horas eleva a acetilação de histona (H3K9) e reverte a hipoacetilação induzida por LPS (48). Por conseguinte o acetato pode, na verdade, inibir a expressão da enzima sem inibir diretamente sua atividade. O resultado prático, no entanto, é o mesmo. Outra possibilidade é que o acetato tenha aumentado a acetilação de histona por servir como substrato para a HAT, aumentando, dessa forma, a atividade dessa enzima.

Soliman et al. também testaram o acetato em amostras de fígado. O mesmo tratamento utilizado nos experimentos com cérebro não alterou a acetilação de histonas em amostras de fígado sugerindo que o efeito do acetato pode ser órgão específico (45). Essa especificidade pode, em parte, ser explicada pela presença de transportadores que permitam a entrada de diferentes AGCC. Como mencionado anteriormente, o transporte de AGCC para e meio intracelular é mediado por transportadores de monocarboxilatos (MCT). O butirato, por exemplo, é transportado via MCT1 e a presença de outros AGCC no meio pode reduzir a eficiência do sistema. O butirato pode também estimular a expressão do transportador, dessa forma pode criar um sistema de retroalimentação positiva que intensifica sua difusão para o meio intracelular (145). O estímulo do butirato à expressão do transportador MCT1 foi associado em um estudo à ativação do NF- κ B uma vez que o bloqueio farmacológico deste impedia o incremento da expressão do MCT1 induzida pelo butirato (137). Isso sugere que a ativação da inflamação via NF- κ B aumenta a capacidade da célula de absorver butirato do meio. Sendo esse AGCC um composto, em princípio, anti-inflamatório, pode-se imaginar nesse caso

um efeito de retroalimentação negativa onde a ativação inflamatória aumenta a captação da molécula anti-inflamatória evitando assim ativação excessiva da célula. Efeito semelhante pode ter ocorrido com o acetato nas culturas ativadas com LPS.

O fato de a tricostatina exibir efeito citoprotetor semelhante ao do acetato não implica necessariamente que tenha o mesmo mecanismo de ação. Os resultados semelhantes podem ser mera coincidência. Entretanto, quando foi aferida a concentração de TNF- α , mais uma vez a tricostatina mimetizou os efeitos do acetato o que diminui, mas não exclui completamente, a possibilidade de que a semelhança de resultados ocorra ao acaso. Uma forma de eliminar esse elemento de incerteza é tratar as culturas simultaneamente com tricostatina e acetato. Se essas drogas produzem efeitos semelhantes por mecanismos diferentes então suas ações devem se somar, ou seja, os tratamentos simultâneo com as duas drogas devem melhorar ainda mais a viabilidade celular e estimular de forma mais intensa a produção de TNF- α . Em relação a produção de TNF- α , a comparação entre o grupo acetato + tricostatina + LPS mostrou aumento em relação ao grupo tricostatina + LPS ($p < 0,001$), mas foi inferior ao grupo acetato + LPS ($p < 0,001$) (Figura 20). Tanto nesse experimento quanto no experimento anterior (Figura 19), fica claro que acetato e tricostatina têm efeitos semelhantes, porém o acetato (25 mM) induz maior produção de TNF- α que a tricostatina (1 ng/ml). O fato de o grupo acetato + tricostatina + LPS apresentar resultado intermediário entre os dois grupos mostra que esses dois fármacos competem pelo mesmo sítio de ação. Da mesma forma, não ocorre somatória de efeitos no experimento de viabilidade

celular por MTT. Não há diferença estatística entre o grupo acetato + LPS na comparação com o grupo Acetato + tricostatina + LPS. Com base nesses resultados pode-se concluir que o acetato induz aumento da expressão de TNF- α e melhora da viabilidade celular por mecanismo epigenético.

O experimento anterior (figura 20) mostra que o efeito do acetato é epigenético, mas não esclarece se ocorre por inibição da HDAC ou estímulo a atividade de HAT. Essa pergunta foi esclarecida pela aferição das atividades de HDAC e HAT. O acetato não alterou os níveis de atividade de HDAC, mas aumentou a atividade de HAT no grupo acetato + LPS em relação ao grupo LPS. Esses resultados sugerem que o efeito do acetato está restrito a HAT, sem nenhuma interferência na atividade de HDAC. Já foram mencionadas anteriormente as incertezas em relação às ações do acetato na atividade de HDAC (45, 48, 144). Entretanto, se o efeito do acetato está restrito à HAT, deve-se questionar porque não ocorreu somatória dos efeitos quando o acetato foi associado a um inibidor específico da HDAC. Uma possibilidade é que, nas doses utilizadas, ambas as drogas tenham induzido acetilação das histonas em um nível máximo, ou próximo disso. Não permitindo, dessa forma, que a associação de um segundo fármaco acentuasse os efeitos do primeiro, isto é, um esgotamento dos sítios disponíveis para acetilação.

Diante da constatação de que o acetato melhora a viabilidade celular da microglia estimulada com LPS por via epigenética, o objetivo seguinte foi identificar o mecanismo subjacente a esse processo. Nesse sentido, diversos autores mostraram relação entre inibidores de HDAC e HAT com autofagia.

Foi demonstrado que inibidores de HDACs como a tricostatina, SAHA e outros induzem autofagia agindo diretamente ao nível da transcrição gênica (119). É interessante salientar que HDACs específicas podem induzir ou inibir autofagia, logo o uso de inibidores de HDACs específicas pode ter o efeito oposto de inibir ou mesmo bloquear autofagia, por exemplo, a inibição da HDAC6 via RNA de interferência ou por manipulação genética, “knockout”, bloqueia autofagia (146, 147). Isso se explica por ser a HDAC6 enzima encontrada no citoplasma com funções diretamente relacionadas a autofagia (146). Por outro lado, a inibição da expressão das HDACs 4 e/ou 5 leva à indução de autofagia (148-150).

A relação entre HATs específicas e autofagia não é menos complexa. Lin et al. demonstraram que a TIP60 tem a capacidade de acetilar e, consequentemente, estimular a proteína ULK1. Dessa forma iniciando o processo autofágico (151). Por outro lado, Pietrocola et al. demonstraram que a inibição à atividade da família EP300 induz autofagia. É interessante comentar que esse últimos autores realizaram experimentos de enucleação e conseguiram reproduzir seus resultados em citoplasmas desprovidos de núcleos. Ficou claro que a indução da autofagia ocorria por inibição de enzimas citoplasmáticas, não tendo, portanto, nenhuma relação com a acetilação de histonas(152). Nossos resultados diferem desses autores por sugerirem que o efeito do acetato ocorre no núcleo via acetatilação de histonas. Isso fica evidente porque houve sobreposição de efeitos quando acetato e tricostatina foram utilizados simultaneamente (Figura 20). Além disso, os resultados da dosagem de citocinas por CBA (Figura 12) foram reproduzidos pela análise de PCR em tempo real mostrando que o efeito ocorria ao nível da

transcrição gênica (Figura 13) e houve ainda aumento da expressão gênica de ATG5 e ATG12 (Figura 25).

Os resultados de PCR em tempo real sugerem que o acetato age através de um mecanismo epigenético para estimular a autofagia, mas os resultados que confirmam a indução desse processo nas culturas são a aferição da proteína p62 por WB e a quantificação dos lisossomos com lisotracker (Figuras 22 e 23). Não existe uma técnica perfeita para comprovar a indução de autofagia, por isso é necessário combinar diferentes técnicas (153). Todavia, a simples constatação da autofagia nas células não é suficiente para comprovar que esse mecanismo esteja, de fato, atuando de forma citoprotetora. Nesse sentido, a inibição da autofagia com a cloroquina reverteu o efeito citoprotetor do acetato com redução da viabilidade celular, comprovando a relevância desse processo para preservação das células. Por outro lado, chama atenção na dosagem de LDH a redução da viabilidade celular no controle “cloroquina” (Figura 24). Aparentemente, a cloroquina induziu efeito tóxico que foi evidenciado apenas no experimento de LDH. Essa alteração pode ser explicada pelo tempo de duração do experimento, 48 horas. Nesse período ocorre importante crescimento das culturas e a padronização dos experimentos estabeleceu como volume de 1 ml de meio por poço de placa de 6 poços. Portanto, no final do experimento, pode já haver depleção de nutrientes no meio de cultura o que não prejudica a viabilidade das células do grupo controle (veículo), mas interfere nas células que estão recebendo um inibidor de autofagia como a cloroquina. O fato de esse fenômeno ocorrer no final do processo, quando já

ocorreu o crescimento da cultura, pode explicar porque esse fenômeno não foi detectado pelo experimento de MTT.

Por fim, é importante entender como o acetato poderia mimetizar o efeito de um inibidor de HDAC como a tricostatina, ou seja, como poderia aumentar os níveis de acetilação de histona. Trabalhando com butirato Donohoe et al. propuseram um mecanismo que se aplica perfeitamente ao acetato. Esses autores demonstraram que, em baixa concentração, o butirato age diretamente na HDAC. Nessa situação, a acetilação resultante das histonas é completamente dependente da inibição da HDAC. Em doses maiores uma parte do butirato é utilizada pelas mitocôndrias produzindo citrato que é transportado ao citosol é convertido pela enzima ATP citrato liase (ACL) em acetil-CoA(154). A ACL é abundante no núcleo e regula a acetilação de histonas em associação com a HAT (GCN5)(121). Quanto maior a concentração de butirato, maior a participação da ACL na acetilação das histonas(154). Portanto, o acetato pode contribuir para a acetilação de histonas pelas mesmas vias propostas para o butirato, sem que seja necessário a participação da HDAC.

É importante comentar os resultados de Tang et al.. Esses autores sugeriram mecanismo de indução de autofagia pelo propionato que é completamente diferente dos mecanismos de ação clássicos dos AGCC. Eles demonstraram que o propionato age diretamente nas mitocôndrias reduzindo a produção de ATP a aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio. A redução do ATP inibe a via da mTOR ativando autofagia, nesse caso principalmente mitofagia (111). A hipótese de que o acetato possa induzir autofagia por

mecanismo relacionado às mitocôndrias foi testada por PCR em tempo real de genes relacionados a biogênese mitocondrial. Dos 4 genes testados, apenas o Nd 1 mostrou alteração na comparação entre o grupo acetato e o grupo controle. Não houve diferenças entre os grupos LPS e acetato mais LPS (Figura 27). Além disso, o ensaio mitosox não mostrou diferenças entre os grupos. Esse ensaio permite quantificar a produção mitocondrial de superóxido em células vivas (155). A ausência de diferenças entre os grupos sugere que o acetato não interfere na produção de espécies reativas de oxigênio quando a microglia é ativada por LPS (Figura 26). Por conseguinte, uma possível ação do acetato via alteração mitocondrial não explica adequadamente os resultados obtidos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse projeto iniciou com o objetivo de estudar efeitos imunomoduladores do acetato que, até então, eram vistos como anti-inflamatórios. Durante seu desenvolvimento, os experimentos mostraram um inesperado efeito de melhora da viabilidade celular quando o esperado, a partir dos dados da literatura, seria acentuação da morte celular por apoptose. A visão inicial do acetato como substância anti-inflamatória levou a idéia de que essa citoproteção observada era, na verdade, secundária à redução da presença de mediadores inflamatórios no meio de cultura. Após longa sucessão de experimentos nos quais os resultados contrariavam nossas expectativas, ficou claro que o acetato não podia ser definido como substância anti-inflamatória e que seu efeito de preservação da viabilidade celular não ocorria de forma indireta, sendo, na verdade, consequência de ação direta nas células.

Nossos resultados e os de Tang et al. mostram que os AGCC apesar de descritos como substâncias pró-apoptóticas também ativam autofagia que protege as células de estímulos nocivos e preserva a viabilidade celular (65, 111). A relevância desse achado é óbvia se considerarmos que os AGCC e outros fármacos inibidores de HDAC são propostos como tratamento para indução de morte celular em tumores (119). Nessa situação, a indução simultânea de autofagia pode proteger as células tumorais e diminuir a eficiência da quimioterapia. Pode ser necessário, portanto, a associação com fármaco inibidor de autofagia para melhorar a eficiência do tratamento (119).

Deve-se questionar qual o propósito de estimular autofagia em células da microglia. Em situações de inflamação de SNC mediada por mecanismos autoimunes como na esclerose múltipla, induzir autofagia em células da microglia e macrófagos infiltrantes pode contribuir para manter a viabilidade celular dessas células por mais tempo e, dessa forma, prolongar o processo retardando a melhora clínica. De fato, a relevância da autofagia como instrumento terapêutico se destaca em relação às doenças neurodegenerativas. Em muitas dessas doenças, o processo patológico ocorre primariamente nos neurônios pelo acúmulo de agregados de proteínas mal formadas (156).

Para que o uso do acetato como tratamento clínico se torne viável é necessário considerar alguns fatores. Em primeiro lugar, a concentração utilizada nos experimentos (25 mM) está muito acima das concentrações fisiológicas descritas na literatura (70). Nesse sentido, o acetato já foi testado na forma de gliceriltriacetato, ou triacetim, que funciona como doador de acetato. Esse composto foi usado em doses elevadas (4,5 g/kg/dia) em crianças com doença de Canavam, uma forma rara de leucodistrofia hereditária, e mostrou-se bem tolerado, sem que nenhum efeito adverso fosse relatado (157). Por conseguinte, a elevada concentração utilizada nesse trabalho não é obstáculo a futuros estudos clínicos.

Outro fator a ser considerado é que, como já mencionado anteriormente, o acetato é captado preferencialmente pela astroglia enquanto os neurônios captam a glicose (142). Isso significa que administrar acetato pode ser inútil para tratamento de doenças neurodegenerativas, pois o acetato não seria captado pelos neurônios. Mais uma vez, o triacetim pode ser uma opção viável para levar o

acetato ao interior dos neurônios, pois é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica e a membrana plasmática sem a necessidade de transportadores específicos (158).

Na prática científica, é comum apontar em um objetivo inicial e terminar em um objetivo completamente diferente. Nosso objetivo inicial era estudar o efeito da leptina na microglia, o acetato, representava uma parte menos importante do projeto. Todavia, passou de coadjuvante a ator principal. Agora concluímos que modula a ativação inflamatória da microglia pelo LPS e induz autofagia, sendo esse último achado o mais relevante. Esperamos que no futuro esse AGCC seja testado e aprovado para uso clínico, pois, na verdade, o verdadeiro objetivo desse e de qualquer outro estudo científico não é estudar a ativação de uma célula, mas melhorar a qualidade de vida de seres humanos.

8 CONCLUSÕES

O acetato possui efeitos imunomoduladores que não podem ser definidos como pró ou anti-inflamatórios, pois pode, ao mesmo tempo, estimular e inibir a expressão de citocinas inflamatórias. Os efeitos citoprotetores ocorrem por ação direta nas células, ou seja, não são secundários ao efeito imunomodulador.

Concluimos ainda que:

- O acetato estimula de forma dose dependente a produção de TNF- α em células da linhagem C8-B4 ativadas com LPS. O estímulo à produção de TNF- α ocorre por mecanismo epigenético. A participação dos receptores GPR nesse processo não foi completamente descartada.
- O acetato também estimula a produção de TNF- α em culturas primárias de microglia de camundongos.
- O acetato inibe a produção de IL-6 em células da linhagem C8-B4 de microglia ativadas por LPS.
- O acetato melhora a viabilidade celular de células da linhagem C8-B4 de microglia ativadas por LPS. O mecanismo citoprotetor responsável pela melhora da viabilidade celular é a indução de autofagia.
- O acetato induz autofagia por mecanismo epigenético que é independente dos receptores de AGCC, GPR41 e 43.

REFERENCIAS*

1. Dickinson JR. Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces Cerevisiae*, 2nd Edition. 2nd ed. Philadelphia, PA: Taylor and Francis; 1999.
2. Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, Ducatelle R, Zabielski R, Van Immerseel F. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev*. 2010 Dec;23(2):366-84.
3. Cummings JH. Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. *Lancet*. 1983 May 28;1(8335):1206-9.
4. Miller TL, Wolin MJ. Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr*. 1979 Jan;32(1):164-72.
5. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*. 1991 Jun;70(6):443-59.
6. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1031-64.
7. Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*. 1981 Sep;22(9):763-79.
8. Cummings JH, Englyst HN, Wiggins HS. The role of carbohydrates in lower gut function. *Nutr Rev*. 1986 Feb;44(2):50-4.
9. Cummings JH, Englyst HN. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr*. 1987 May;45(5 Suppl):1243-55.
10. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. 2006 Mar;40(3):235-43.
11. Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998 Jun;12(6):499-507.
12. Owens FN, Isaacson HR. Ruminant microbial yields: factors influencing synthesis and bypass. *Fed Proc*. 1977 Feb;36(2):198-202.
13. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 May;294(1):1-8.
14. Meijer K, de Vos P, Priebe MG. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 Nov;13(6):715-21.

15. Hallert C, Bjorck I, Nyman M, Pousette A, Granno C, Svensson H. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis*. 2003 Mar;9(2):116-21.
16. Scheppach W, Muller JG, Boxberger F, Dusel G, Richter F, Bartram HP, et al. Histological changes in the colonic mucosa following irrigation with short-chain fatty acids. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997 Feb;9(2):163-8.
17. Scheppach W. Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. A placebo-controlled trial. German-Austrian SCFA Study Group. *Dig Dis Sci*. 1996 Nov;41(11):2254-9.
18. Steinhart AH, Hiruki T, Brzezinski A, Baker JP. Treatment of left-sided ulcerative colitis with butyrate enemas: a controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 1996 Oct;10(5):729-36.
19. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*. 2003 Mar 28;278(13):11312-9.
20. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*. 2003 Jul 11;278(28):25481-9.
21. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009 Oct 29;461(7268):1282-6.
22. Ge H, Li X, Weizmann J, Wang P, Baribault H, Chen JL, et al. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology*. 2008 Sep;149(9):4519-26.
23. Zaibi MS, Stocker CJ, O'Dowd J, Davies A, Bellahcene M, Cawthorne MA, et al. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS Lett*. 2010 Jun 3;584(11):2381-6.
24. Xiong Y, Miyamoto N, Shibata K, Valasek MA, Motoike T, Kedzierski RM, et al. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 27;101(4):1045-50.
25. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):661-71.

26. Bellahcene M, O'Dowd JF, Wargent ET, Zaibi MS, Hislop DC, Ngala RA, et al. Male mice that lack the G-protein-coupled receptor GPR41 have low energy expenditure and increased body fat content. *Br J Nutr*. 2013 May 28;109(10):1755-64.
27. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004 May;4(5):371-9.
28. Landman RE, Puder JJ, Xiao E, Freda PU, Ferin M, Wardlaw SL. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Mar;88(3):1285-91.
29. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998 Aug 27;394(6696):897-901.
30. Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, Perna F, Sanna V, De Rosa V, et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 5;102(14):5150-5.
31. Orbak Z, Ertekin V, Akcay F, Ozkan B, Ors R. Serum leptin levels in neonatal bacterial septicemia. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2003 Jun;16(5):727-31.
32. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 12;110(11):4410-5.
33. Weber M, Pehl U, Breer H, Strotmann J. Olfactory receptor expressed in ganglia of the autonomic nervous system. *J Neurosci Res*. 2002 Apr 15;68(2):176-84.
34. Rafalzik S, Pehl U, Ott D, Strotmann J, Wolff M, Gerstberger R. Cholinergic signal transduction in the mouse sphenopalatine ganglion. *Brain Res*. 2008 Nov 19;1241:42-55.
35. Graff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev*. 2011 Apr;91(2):603-49.
36. Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron*. 2008 Dec 26;60(6):961-74.
37. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):263-71.
38. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41-5.
39. Berndsen CE, Denu JM. Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Curr Opin Struct Biol*. 2008 Dec;18(6):682-9.

40. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan;10(1):32-42.
41. Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Mar;983:84-100.
42. Sheikh BN. Crafting the brain - role of histone acetyltransferases in neural development and disease. *Cell Tissue Res.* 2014 Jun;356(3):553-73.
43. Dekker FJ, Haisma HJ. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug Discov Today.* 2009 Oct;14(19-20):942-8.
44. Cousens LS, Gallwitz D, Alberts BM. Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. *J Biol Chem.* 1979 Mar 10;254(5):1716-23.
45. Soliman ML, Rosenberger TA. Acetate supplementation increases brain histone acetylation and inhibits histone deacetylase activity and expression. *Mol Cell Biochem.* 2011 Jun;352(1-2):173-80.
46. Soliman ML, Smith MD, Houdek HM, Rosenberger TA. Acetate supplementation modulates brain histone acetylation and decreases interleukin-1beta expression in a rat model of neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2012;9:51.
47. Brissette CA, Houdek HM, Floden AM, Rosenberger TA. Acetate supplementation reduces microglia activation and brain interleukin-1beta levels in a rat model of Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation.* 2012;9:249.
48. Soliman ML, Puig KL, Combs CK, Rosenberger TA. Acetate reduces microglia inflammatory signaling in vitro. *J Neurochem.* 2012 Nov;123(4):555-67.
49. Soliman ML, Combs CK, Rosenberger TA. Modulation of inflammatory cytokines and mitogen-activated protein kinases by acetate in primary astrocytes. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013 Mar;8(1):287-300.
50. Saemann MD, Bohmig GA, Osterreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J.* 2000 Dec;14(15):2380-2.
51. Park JS, Lee EJ, Lee JC, Kim WK, Kim HS. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Int Immunopharmacol.* 2007 Jan;7(1):70-7.

52. Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA, Calder PC. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci.* 2003 Aug 15;73(13):1683-90.
53. Bocker U, Nebe T, Herweck F, Holt L, Panja A, Jobin C, et al. Butyrate modulates intestinal epithelial cell-mediated neutrophil migration. *Clin Exp Immunol.* 2003 Jan;131(1):53-60.
54. Vinolo MA, Rodrigues HG, Hatanaka E, Hebeda CB, Farsky SH, Curi R. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clin Sci (Lond).* 2009 Nov;117(9):331-8.
55. Maa MC, Chang MY, Hsieh MY, Chen YJ, Yang CJ, Chen ZC, et al. Butyrate reduced lipopolysaccharide-mediated macrophage migration by suppression of Src enhancement and focal adhesion kinase activity. *J Nutr Biochem.* 2010 Dec;21(12):1186-92.
56. Cox MA, Jackson J, Stanton M, Rojas-Triana A, Bober L, Lavery M, et al. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol.* 2009 Nov 28;15(44):5549-57.
57. Sina C, Gavrilova O, Forster M, Till A, Derer S, Hildebrand F, et al. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7514-22.
58. Huuskonen J, Suuronen T, Nuutinen T, Kyrylenko S, Salminen A. Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids. *Br J Pharmacol.* 2004 Mar;141(5):874-80.
59. Kim HS, Whang SY, Woo MS, Park JS, Kim WK, Han IO. Sodium butyrate suppresses interferon-gamma-, but not lipopolysaccharide-mediated induction of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in microglia. *J Neuroimmunol.* 2004 Jun;151(1-2):85-93.
60. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut.* 2000 Sep;47(3):397-403.
61. Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology.* 2000 Apr;118(4):724-34.
62. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 1998 Aug;115(2):357-69.

63. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998 Apr;42(4):477-84.
64. Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, et al. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery*. 2001 Aug;130(2):363-9.
65. Comalada M, Bailon E, de Haro O, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A, et al. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006 Aug;132(8):487-97.
66. Fung KY, Brierley GV, Henderson S, Hoffmann P, McColl SR, Lockett T, et al. Butyrate-induced apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells includes induction of a cell stress response. *J Proteome Res*. 2011 Apr 1;10(4):1860-9.
67. Fung KY, Lewanowitsch T, Henderson ST, Priebe I, Hoffmann P, McColl SR, et al. Proteomic analysis of butyrate effects and loss of butyrate sensitivity in HT29 colorectal cancer cells. *J Proteome Res*. 2009 Mar;8(3):1220-7.
68. Bailon E, Cueto-Sola M, Utrilla P, Rodriguez-Cabezas ME, Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, et al. Butyrate in vitro immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. *Immunobiology*. 2010 Nov;215(11):863-73.
69. Aoyama M, Kotani J, Usami M. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition*. 2010 Jun;26(6):653-61.
70. Siler SQ, Neese RA, Hellerstein MK. De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole-body lipid balances in humans after acute alcohol consumption. *Am J Clin Nutr*. 1999 Nov;70(5):928-36.
71. Thompson GN, Walter JH, Bresson JL, Ford GC, Lyonnet SL, Chalmers RA, et al. Sources of propionate in inborn errors of propionate metabolism. *Metabolism*. 1990 Nov;39(11):1133-7.
72. Trauner DA, Nyhan WL, Sweetman L. Short-chain organic acidemia and Reye's syndrome. *Neurology*. 1975 Mar;25(3):296-8.
73. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):841-5.
74. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011 Apr;91(2):461-553.

75. Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 1;81(3):374-89.
76. Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. *Nat Med*. 2011 Jan;17(1):64-70.
77. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996 Aug;19(8):312-8.
78. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1314-8.
79. Eyo UB, Dailey ME. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013 Jun;8(3):494-509.
80. Greer JM, Capecchi MR. Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron*. 2002 Jan 3;33(1):23-34.
81. Graybiel AM, Rauch SL. Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuron*. 2000 Nov;28(2):343-7.
82. Derecki NC, Privman E, Kipnis J. Rett syndrome and other autism spectrum disorders--brain diseases of immune malfunction? *Mol Psychiatry*. 2010 Apr;15(4):355-63.
83. Maezawa I, Jin LW. Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate. *J Neurosci*. 2010 Apr 14;30(15):5346-56.
84. Derecki NC, Cronk JC, Lu Z, Xu E, Abbott SB, Guyenet PG, et al. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature*. 2012 Apr 5;484(7392):105-9.
85. Sarchielli P, Greco L, Floridi A, Gallai V. Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid. *Arch Neurol*. 2003 Aug;60(8):1082-8.
86. Stover JF, Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Lowitzsch K, Kempinski OS. Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. *Eur J Clin Invest*. 1997 Dec;27(12):1038-43.
87. Srinivasan R, Sailasuta N, Hurd R, Nelson S, Pelletier D. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain*. 2005 May;128(Pt 5):1016-25.
88. Piani D, Frei K, Do KQ, Cuenod M, Fontana A. Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci Lett*. 1991 Dec 9;133(2):159-62.

89. Piani D, Spranger M, Frei K, Schaffner A, Fontana A. Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *Eur J Immunol.* 1992 Sep;22(9):2429-36.
90. Yawata I, Takeuchi H, Doi Y, Liang J, Mizuno T, Suzumura A. Macrophage-induced neurotoxicity is mediated by glutamate and attenuated by glutaminase inhibitors and gap junction inhibitors. *Life Sci.* 2008 May 23;82(21-22):1111-6.
91. Basso AS, Frenkel D, Quintana FJ, Costa-Pinto FA, Petrovic-Stojkovic S, Puckett L, et al. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2008 Apr;118(4):1532-43.
92. Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2000 Jan;6(1):67-70.
93. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011 Nov 11;147(4):728-41.
94. Onodera J, Ohsumi Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem.* 2005 Sep 9;280(36):31582-6.
95. Suzuki SW, Onodera J, Ohsumi Y. Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS One.* 2011;6(2):e17412.
96. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature.* 2010 Jun 17;465(7300):942-6.
97. Ezaki J, Matsumoto N, Takeda-Ezaki M, Komatsu M, Takahashi K, Hiraoka Y, et al. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy.* 2011 Jul;7(7):727-36.
98. Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* 2011 Mar 1;25(5):460-70.
99. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009 Apr 30;458(7242):1131-5.
100. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011 Sep 2;146(5):682-95.
101. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2010 Oct;90(4):1383-435.

102. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011 Mar;7(3):279-96.
103. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:125-56.
104. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005 Nov 21;171(4):603-14.
105. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1149-63.
106. Bartlett BJ, Isakson P, Lewerenz J, Sanchez H, Kotzebue RW, Cumming RC, et al. p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy*. 2011 Jun;7(6):572-83.
107. Cui J, Bai XY, Shi S, Cui S, Hong Q, Cai G, et al. Age-related changes in the function of autophagy in rat kidneys. *Age (Dordr)*. 2012 Apr;34(2):329-39.
108. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, et al. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*. 2002 Jan;160(1):255-63.
109. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*. 2009 Jun 12;137(6):1001-4.
110. Kim JY, Ozato K. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF-kappaB activity. *J Immunol*. 2009 Feb 15;182(4):2131-40.
111. Tang Y, Chen Y, Jiang H, Nie D. Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 2011 Apr;18(4):602-18.
112. Schroeder S, Pendl T, Zimmermann A, Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Ruckenstein C, et al. Acetyl-coenzyme A: a metabolic master regulator of autophagy and longevity. *Autophagy*. 2014 Jul;10(7):1335-7.
113. Inoue D, Tsujimoto G, Kimura I. Regulation of Energy Homeostasis by GPR41. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:81.

114. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3823-31.
115. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014 Aug;25(4):453-72.
116. Shin S, Brodsky IE. The inflammasome: Learning from bacterial evasion strategies. *Semin Immunol*. 2015 Mar;27(2):102-10.
117. Alliot F, Marty MC, Cambier D, Pessac B. A spontaneously immortalized mouse microglial cell line expressing CD4. *Brain Res Dev Brain Res*. 1996 Aug 20;95(1):140-3.
118. Xu X, Kim JA, Zuo Z. Isoflurane preconditioning reduces mouse microglial activation and injury induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Neuroscience*. 2008 Jun 26;154(3):1002-8.
119. Koenke E, Witt O, Oehme I. HDAC Family Members Intertwined in the Regulation of Autophagy: A Druggable Vulnerability in Aggressive Tumor Entities. *Cells*. 2015;4(2):135-68.
120. Donohoe DR, Bultman SJ. Metaboloepigenetics: interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. *J Cell Physiol*. 2012 Sep;227(9):3169-77.
121. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1076-80.
122. Carew JS, Medina EC, Esquivel JA, 2nd, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, et al. Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med*. 2010 Oct;14(10):2448-59.
123. Carew JS, Nawrocki ST, Kahue CN, Zhang H, Yang C, Chung L, et al. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):313-22.
124. Dupere-Richer D, Kinal M, Menasche V, Nielsen TH, Del Rincon S, Pettersson F, et al. Vorinostat-induced autophagy switches from a death-promoting to a cytoprotective signal to drive acquired resistance. *Cell Death Dis*. 2013;4:e486.
125. Xie M, Kong Y, Tan W, May H, Battiprolu PK, Pedrozo Z, et al. Histone deacetylase inhibition blunts ischemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy. *Circulation*. 2014 Mar 11;129(10):1139-51.

126. Eshak ES, Iso H, Date C, Kikuchi S, Watanabe Y, Wada Y, et al. Dietary fiber intake is associated with reduced risk of mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women. *J Nutr*. 2010 Aug;140(8):1445-53.
127. Lattimer JM, Haub MD. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*. 2010 Dec;2(12):1266-89.
128. Papathanasopoulos A, Camilleri M. Dietary fiber supplements: effects in obesity and metabolic syndrome and relationship to gastrointestinal functions. *Gastroenterology*. 2010 Jan;138(1):65-72 e1-2.
129. Park Y, Subar AF, Hollenbeck A, Schatzkin A. Dietary fiber intake and mortality in the NIH-AARP diet and health study. *Arch Intern Med*. 2011 Jun 27;171(12):1061-8.
130. Qiu C, Coughlin KB, Frederick IO, Sorensen TK, Williams MA. Dietary fiber intake in early pregnancy and risk of subsequent preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2008 Aug;21(8):903-9.
131. Franco OH, Burger H, Lebrun CE, Peeters PH, Lamberts SW, Grobbee DE, et al. Higher dietary intake of lignans is associated with better cognitive performance in postmenopausal women. *J Nutr*. 2005 May;135(5):1190-5.
132. Smith AP, Wilds A. Effects of cereal bars for breakfast and mid-morning snacks on mood and memory. *Int J Food Sci Nutr*. 2009;60 Suppl 4:63-9.
133. Kaczmarczyk MM, Miller MJ, Freund GG. The health benefits of dietary fiber: beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism*. 2012 Aug;61(8):1058-66.
134. Birt DF, Phillips GJ. Diet, Genes, and Microbes: Complexities of Colon Cancer Prevention. *Toxicol Pathol*. 2013 Oct 15.
135. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
136. Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J Neurosci Methods*. 2000 Mar 15;96(2):147-52.
137. Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem*. 2008 Apr 1;103(5):1452-63.
138. Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem*. 2005 Jul;94(1):1-14.

139. Moreira TJ, Pierre K, Maekawa F, Repond C, Cebere A, Liljequist S, et al. Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009 Jul;29(7):1273-83.
140. Berl S, Frigyesi TL. The turnover of glutamate, glutamine, aspartate and GABA labeled with [1-¹⁴C]acetate in caudate nucleus, thalamus and motor cortex (cat). *Brain Res.* 1969 Feb;12(2):444-55.
141. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th, updated edition ed. Saunders E, editor.; 2005.
142. Patel AB, de Graaf RA, Mason GF, Rothman DL, Shulman RG, Behar KL. The contribution of GABA to glutamate/glutamine cycling and energy metabolism in the rat cortex in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 12;102(15):5588-93.
143. Licciardi PV, Ververis K, Karagiannis TC. Histone deacetylase inhibition and dietary short-chain Fatty acids. *ISRN Allergy.* 2011;2011:869647.
144. Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem.* 2008 Sep;19(9):587-93.
145. Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol.* 2002 Mar 1;539(Pt 2):361-71.
146. Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.* 2010 Mar 3;29(5):969-80.
147. Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, Generali D, et al. The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res.* 2009 May 15;69(10):4415-23.
148. Kang ZH, Wang CY, Zhang WL, Zhang JT, Yuan CH, Zhao PW, et al. Histone deacetylase HDAC4 promotes gastric cancer SGC-7901 cells progression via p21 repression. *PLoS One.* 2014;9(6):e98894.
149. Peixoto P, Castronovo V, Matheus N, Polese C, Peulen O, Gonzalez A, et al. HDAC5 is required for maintenance of pericentric heterochromatin, and controls cell-cycle progression and survival of human cancer cells. *Cell Death Differ.* 2012 Jul;19(7):1239-52.
150. Roccaro AM, Sacco A, Jia X, Azab AK, Maiso P, Ngo HT, et al. microRNA-dependent modulation of histone acetylation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 2010 Sep 2;116(9):1506-14.

151. Lin SY, Li TY, Liu Q, Zhang C, Li X, Chen Y, et al. GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science*. 2012 Apr 27;336(6080):477-81.
152. Pietrocola F, Lachkar S, Enot DP, Niso-Santano M, Bravo-San Pedro JM, Sica V, et al. Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death Differ*. 2014 Mar;22(3):509-16.
153. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012 Apr;8(4):445-544.
154. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol Cell*. 2012 Nov 30;48(4):612-26.
155. Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, et al. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2008 Oct;14(10):1097-105.
156. Rubinsztein DC, Bento CF, Deretic V. Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases. *J Exp Med*. 2015 Jun 29;212(7):979-90.
157. Segel R, Anikster Y, Zevin S, Steinberg A, Gahl WA, Fisher D, et al. A safety trial of high dose glyceryl triacetate for Canavan disease. *Mol Genet Metab*. 2011 Jul;103(3):203-6.
158. Tsen AR, Long PM, Driscoll HE, Davies MT, Teasdale BA, Penar PL, et al. Triacetin-based acetate supplementation as a chemotherapeutic adjuvant therapy in glioma. *Int J Cancer*. 2014 Mar 15;134(6):1300-10.