

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

Bruna Ruschel Ewald Vega Garcia

**Efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada na
modulação da resposta inflamatória induzida por LPS
em células intestinais Caco-2**

São Paulo

2023

Bruna Ruschel Ewald Vega Garcia

**Efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada na
modulação da resposta inflamatória induzida por LPS
em células intestinais Caco-2**

Versão Original

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

São Paulo

2023

RESUMO

GARCIA, B. R. E. V. **Efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada na modulação da resposta inflamatória induzida por LPS em células intestinais Caco-2** [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-Graduação Nutrição em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública - USP. São Paulo, 2023.

Introdução: A inflamação é um fator presente na fisiopatologia de doenças, e, o intestino, órgão susceptível a disfunções e à disbiose, que está em constante exposição a microrganismos, pode estar associado a este processo. Por outro lado, aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) podem apresentar efeitos anti-inflamatórios em linhagem celular intestinal. **Objetivo:** Investigar os efeitos da suplementação de ACR, *in vitro*, na modulação da resposta inflamatória e do estresse oxidativo induzida por LPS em modelo de células intestinais Caco-2. **Métodos:** As culturas de células foram distribuídas em seis grupos, sendo: dois grupos controle — controle com meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium sem ACR (CTL0) e com ACR (CTL) — e quatro grupos suplementados — grupo leucina (LEU), grupo isoleucina (ISO), grupo valina (VAL) e associação de ACR (LIV). Foi adotado um protocolo de pré-tratamento, com os ACR e o LPS. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl 2,5-difenil tetrazolium])). A análise de proteínas (mTOR, AKT, AMPK, NF- κ B, TAK-1 e JNK) foi feita por *Western Blotting*. A dosagem de citocina IL-8 no sobrenadante de cultura celular foi realizada por meio do *kit* Multiplex para imunoensaio. Foram avaliados componentes do sistema antioxidante relacionado à glutatona (GSH, GSSG e GPx) por meio de *kit* comercial. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. **Resultados:** No teste de viabilidade celular por MTT, verificou-se que os grupos tratados com ACR e LPS não apresentaram comprometimento da viabilidade celular em relação ao grupo CTL sem LPS. Os grupos CTL0, CTL, VAL e LIV, quando estimulados com LPS, apresentaram maior capacidade de síntese, *in vitro*, de IL-8, bem como maior fosforilação das proteínas JNK e NF- κ B em relação aos seus respectivos grupos sem LPS. A suplementação. Todavia, as células estimuladas com LPS e suplementadas com leucina e isoleucina apresentaram capacidade de síntese, *in vitro*, de IL-8 e fosforilação das proteínas JNK e NF- κ B que não diferiram significativamente das células suplementadas com esses aminoácidos e não estimuladas com LPS. A ausência de ACR (grupo CTL0) e a suplementação desses aminoácidos, *in vitro*, em células intestinais Caco-2, tratadas com ou sem LPS, não induziram alteração da atividade da enzima GPx e da razão intracelular GSH/GSSG. **Conclusões:** Os aminoácidos leucina e isoleucina apresentaram potencial efeito anti-inflamatório nas células Caco-2 por meio da modulação da fosforilação das proteínas JNK e NF- κ B, cujo fato está associado à modulação da síntese, *in vitro*, de IL-8, a qual está envolvida na resposta inflamatória no intestino.

Descritores: Aminoácidos de cadeia ramificada; Lipopolissacarídeo; Inflamação; Epitélio Intestinal; Células Caco-2.

ABSTRACT

GARCIA, B. R. E. V. **Effect of branched-chain amino acids on the inflammatory response modulation induced by LPS in Caco-2 intestinal cells** [Master's degree]. Postgraduate Program Nutrition in Public Health, School of Public Health - USP. São Paulo, 2023.

Introduction: Inflammation is a factor present in the pathophysiology of diseases, and the intestine, an organ susceptible to dysfunction and dysbiosis, which is constantly exposed to microorganisms, may be associated with this process. On the other hand, branched-chain amino acids (BCAAs) may have anti-inflammatory effects on intestinal cell lines. **Objective:** To investigate the effects of ACR supplementation, in vitro, on the modulation of inflammatory response and oxidative stress induced by LPS in a model of intestinal Caco-2 cells. **Methods:** The cell cultures were divided into six groups, as follows: two control groups — control with Dulbecco's Modified Eagle's Medium without ACR (CTL0) and with ACR (CTL) — and four supplemented groups — leucine group (LEU), isoleucine group (ISO), valine group (VAL) and ACR association (LIV). A pre-treatment protocol was adopted, with ACR and LPS. Cell viability was assessed by MTT reduction assay ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl 2,5-diphenyl tetrazolium] bromide)) Protein analysis (mTOR, AKT, AMPK, NF- κ B, TAK -1 and JNK) was performed by Western Blotting. The dosage of cytokine IL-8 in the cell culture supernatant was performed using the Multiplex kit for immunoassay. Components of the antioxidant system related to glutathione (GSH, GSSG, and GPx) were evaluated by commercial kit. The results were expressed as mean \pm standard error. **Results:** In the cell viability test by MTT, it was verified that the groups treated with ACR and LPS did not show impairment of cell viability compared to the CTL group without LPS. The CTL0, CTL, VAL, and LIV groups, when stimulated with LPS, showed a greater capacity for in vitro synthesis of IL-8, as well as greater phosphorylation of JNK and NF- κ B proteins in relation to their respective groups without LPS. However, cells stimulated with LPS and supplemented with leucine and isoleucine showed in vitro synthesis capacity of IL-8 and phosphorylation of JNK and NF- κ B proteins that did not differ significantly from cells supplemented with these amino acids and not stimulated with LPS. The absence of ACR (CTL0 group) and the supplementation of these amino acids, in vitro, in intestinal Caco-2 cells, treated with or without LPS, did not induce changes in the activity of the GPx enzyme and the intracellular GSH/GSSG ratio. **Conclusions:** The amino acids leucine and isoleucine had a potential anti-inflammatory effect on Caco-2 cells by modulating the phosphorylation of JNK and NF- κ B proteins, which fact is associated with the modulation of the in vitro synthesis of IL-8, which is involved in the inflammatory response in the gut.

Descriptors: Branched-chain amino acids; Lipopolysaccharide; Inflammation; Intestinal Epithelium; Caco-2 cells.