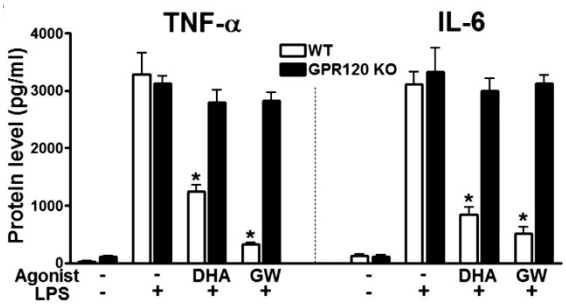
17/03/2017

Aula 2: drylab

GABARITO

1. O gráfico representado na **Figura 2** mostra o nível de citocinas (TNF alpha e IL-6) produzidas por macrófagos da linhagem do tipo selvagem (WT) e macrófagos nocaute para o receptor de Ômega 3 (GPR12 KO). Ambas as linhagens foram estimuladas com LPS (lipopolissacarídeo) e com DHA e GW, ambos agonistas do receptor de Ômega 3- GPR12KO.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram claramente o papel modulador do Ômega 3 nas respostas inflamatórias, onde:



- ✓ Na ausência de LPS e dos agonistas, nenhuma das linhagens produziu uma quantidades apreciáveis de TNF-α e IL-6;
- ✓ Na presença de LPS e na ausência de agonista ambas as linhagens produziram níveis elevados de citocinas TNF- α e IL-6;
- ✓ Na presença do agonista DHA ou GW e do LPS a linhagem do tipo WT (selvagem) produziu uma quantidade significativamente menor de citocinas TNF-α e IL-6 quando comparada a linhagem GPR120 KO (nocaute para o receptor de Ômega 3).
- ✓ O fato dos macrófagos GPR120 KO não responderem aos agonistas de ômega 3 indica que esse receptor, de fato, medeia os efeitos desses lipídeos.

Assim, com esse resultado fica claro o importante papel do Ômega 3 na modulação da resposta inflamatória, uma vez que a ausência do receptor para esse ácido graxo, favorece um aumento nos níveis de citocinas da inflamação aguda.

Os gráficos representados na **Figura 3 A** e **B** mostram os níveis de expressão gênica dos diferentes marcadores de macrófagos do fenótipo M1 e M2.

O objetivo deste experimento foi demonstrar o impacto da dieta na resposta imune dos animais, onde: Camundongos foram alimentados com dieta comum (NC), dieta rica em lipídeos (HFD) e dieta rica em lipídeos, porém suplementada com ômega 3 (+α3), ambas as linhagens de macrófagos (oriundas desses animais) foram utilizadas para avaliar os níveis de expressão gênica de diversos marcadores de perfis de macrófagos. Assim:

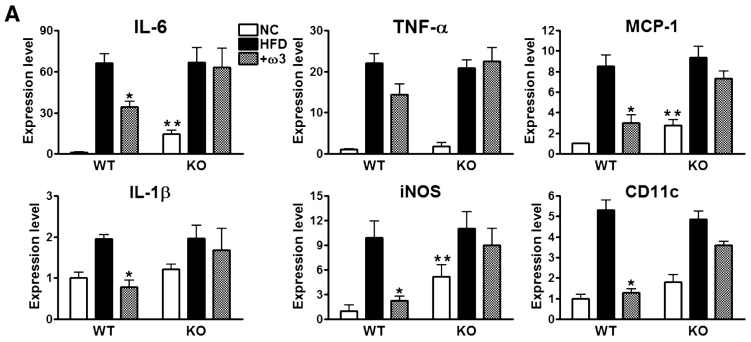


Figura A: Observamos nos gráficos que ambos os animais submetidos à dieta comum não apresentaram níveis alterados de citocinas e marcadores de macrófagos M1. Já os animais submetidos à dieta rica em lipídeos (HFD), tanto os WT quanto os KO, apresentaram níveis elevados de citocinas e marcadores importantes de macrófagos do perfil M1, ou seja, são tendenciosos a uma resposta pró-inflamatória.

Os animais WT submetidos a uma dieta rica em lipídeos, porém suplementada com ômega 3 apresentaram redução significativa da expressão de IL-6, IF-1b, MCP-1 e iNOS (enzima que produz NO) indicando que ômega 3 é capaz, de forma dependente do seu receptor, de inibir o fenótipo pró-inflamatório induzido pela dieta rica em lipídeos. De fato, os animais GPR120KO (KO) submetidos a esta mesma dieta não apresentaram diferença em relação aos animais submetidos à dieta rica em lipídeos. Esse resultado é esperado, uma vez que essa linhagem não apresenta receptor para ômega 3, ou seja a suplementação não faz diferença.

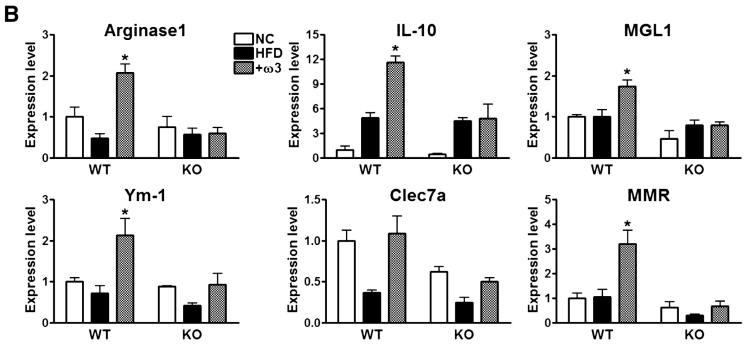


Figura B: Observamos nos gráficos que ambos os animais submetidos a dieta comum não apresentaram níveis alterados de citocinas e marcadores de macrófagos M2. Os animais WT submetidos a dieta rica em lipídeos (HFD) não apresentaram variação significativa da expressão de genes marcadores do perfil M2 em relação aos controles. Por outro lado, os animais alimentados com a combinação de dieta rica em lipídeos e ômega 3 apresentaram aumento significativo da expressão de marcadores de fenótipo M2, de forma receptor GPR120 dependente.

Dessa forma, concluímos com esses resultados que o consumo de lipídeos na dieta favorece uma resposta pró-inflamatória pelos macrófagos do perfil M1 e que o consumo do Ômega 3 na dieta é capaz de controlar a inflamação, polarizando uma resposta anti-inflamatória com a participação de macrófagos do tipo M2.

2. Os experimentos realizados por esse grupo demonstram o papel do Ômega 3 no controle do processo anti-inflamatório, uma vez que ele é capaz de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias com IL-6 e TNFα em macrófagos estimulados com LPS.

3. Esses experimentos demonstraram que o consumo de lipídeos na dieta é capaz de induzir perfil pró-inflamatório nos animais. Já se sabe que a produção de citocinas e mediadores inflamatórios por adipócitos é, em parte, responsável por esse pefil inflamatório. Quanto maior a massa de tecido adiposo, maior a concentração de mediadores produzidos por esse tecido.

4. Sim. Na figura 3 podemos observar que os animais que tiveram a dieta suplementada com Ômega 3 conseguiram controlar a resposta inflamatória a partir da redução dos níveis de expressão gênica de importantes marcadores pró-inflamatórios, além disso houve um aumento na expressão de marcadores e citocinas anti-inflamatórias característica de macrófagos M2. Os experimentos com as células ou animais GPR120 KO demonstram que ômega 3 é capaz de ativar vias de sinalização nas células que bloqueio a atividade de vias que levam à resposta pró-inflamatória.

5. A citocina IL-6 basicamente induz reação de fase aguda, diferenciação celular e inflamação; citocina TNF-α (fator de necrose tumoral alfa) é uma proteína de envolvida na inflamação sistêmica e é uma das citocinas que compõem a reação de fase aguda e é produzida principalmente por macrófagos ativados, mas também pode ser produzida por outras células do sistema imune; citocina IL-1β basicamente induz reação de fase aguda e resposta inflamatória e em grandes quantidades induzem febre. Todas essas citocinas estão envolvidas na fase inicial da resposta inflamatória. TNFα e IL-1β também podem ativar as células endoteliais, promovendo recrutamento de leucócitos para sítios inflamados.

6. A citocina IL-10, através do seu receptor IL-10R, tem efeitos opostos aos de citocinas pró-inflamatórias. Com isso, ela regula respostas inflamatórias, induzindo o reparo tecidual e reestabelecimento da homeostasia.

7. Macrófagos do tipo M1 estão presentes nas fases iniciais (aguda) da resposta inflamatória, e os macrófagos do tipo M2 estão presentes nos estágios finais da inflamação, como proliferação e remodelamento tecidual. Os macrófagos M1 ou clássicos são tipicamente citotóxicos, produzem espécies reativas de oxigênio, NO e citocinas pró-inflamatórias como IL-β e TNFα. Com isso, eles são muito eficientes na eliminação de patógenos, mas também podem causar lesão tecidual. Os macrófagos M2 ou alternativos são fagócitos de células mortas, remodelam a matriz extracelular, participam do processo de neoangiogênese, e secretam citocinas como IL-10 e TGFβ. Além disso tudo, também têm a capacidade de inibir a atividade de linfócitos T.