



O óleo de peixe melhora os alvos genéticos da síndrome de Down em camundongos C57BL e BALB / c



Arthur Pegoretti (11791668)

Bruna Faustino da Silva (11791672)

Laura Alves (11791651)

Maria Gabriela Nascimento (11791693)

Outubro/2020

Introdução

Por que o estudo foi realizado por meio da dieta e nutrição?

- ↪ Alimentos saudáveis, através de preparações dietéticas ou nutracêuticos podem regular a expressão de genes causadores de doenças de volta aos níveis normais.
- ↪ Desacelera o processo da doença reduzindo:
 - Riscos de longo prazo;
 - Custo de tratamento;
 - Toxicidade;
 - Dosagem e sintomas dos medicamentos convencionais.
- ↪ O método do estudo concentra-se no uso de suplementos dietéticos reconhecidos por seus benefícios à saúde a longo prazo.

Introdução



↪ A trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down).

- 1º causa em retardo mental genético;
- Gene RCAN1 (regulador da calcineurina 1).

↪ Super expressão embrionária do RCAN1 e DYRK1A.

- Bloqueia a expressão dos genes relacionados ao NF-AT.

↪ Acredita se que a perda geral de NF-AT seja um possível contribuinte para alguns fenótipos da etiologia da síndrome de Down.

O que é a Síndrome de Down

- Distúrbio complexo e multifatorial;
- Nem todos os pacientes apresentam todas as características;
- A trissomia do cromossomo 21 é uma aneuploidia autossômica, sendo a mais comum nos seres humanos.

↪ Características:

- Rosto- plano e redondo;
- Nariz pequeno;
- Olhos amendoados ;
- Baixo tônus muscular.



O que é a Síndrome de Down

↳ Síndrome de Down primária:

- Pessoas com síndrome de Down com três cópias completas do cromossomo 21 (portanto, um total de 47 cromossomos), são aproximadamente 92% dos casos.

↳ Down Familiar:

- Possuem 46 cromossomos, mas uma cópia extra da parte do cromossomo 21 é presa a outro cromossomo por meio de uma translocação.

Obs: Down é uma deficiência mental e não uma causa do déficit intelectual.

Superexpressão dos genes RCAN1 e DYRK1A e seus mecanismos de ação:

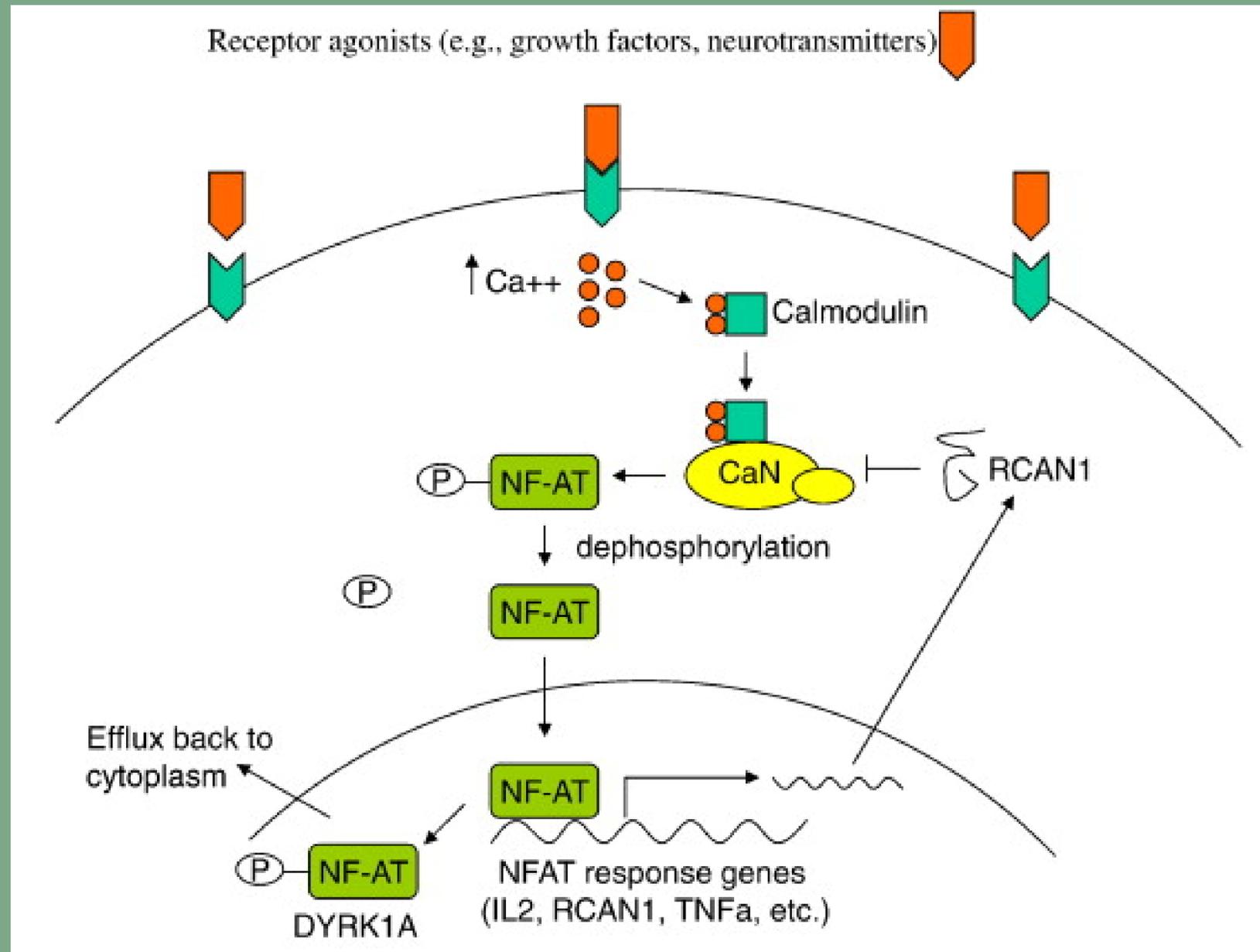
↳ O que são fatores de transcrição?

- Fatores de transcrição são proteínas que regulam a transcrição dos genes, isto é, sua cópia em RNA, a caminho de fazer uma proteína.

↳ O papel do fator de transcrição NF-AT:

- O NF-AT é um fator de transcrição importante no controle da expressão gênica durante a ativação e diferenciação celular.
- A desregulação do NF-AT pode desencadear a perda do controle de diversos mecanismos moleculares e ativar a transformação celular.

Superexpressão dos genes **RCAN1** e **DYK1A** e seus mecanismos de ação:



↪ Em **condições normais**, a liberação de cálcio resulta na **desfosforilação do NF-AT** e na sua **translocação para o núcleo** onde exercerá seu papel.

↪ Na **síndrome de down**, a **proteína RCAN1**, pela sua superexpressão nessa condição, **inibe a calcineurina e não permite a desfosforilação do NF-AT** e sua **migração nuclear**, fazendo então com que não interaja com seus genes alvos.

Óleo de peixe

- Fonte de ácidos graxos, altamente insaturados da série n-3 (HUFA n-3);
- Suas principais substâncias são o EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico);
- São adquiridos pela dieta, uma vez que o corpo humano não sintetiza esses ácidos graxos essenciais.



↪ Envolvido na manutenção:

- Da estrutura da membrana celular;
- Da atividade das proteínas membranares;
- Do sistema monoaminérgico do cérebro;
- De prevenção de doenças.

Óleo de peixe

- Um dos principais constituintes do cérebro são os lipídeos.
- Produzem efeitos sobre a transcrição de genes através de receptores nucleares e fatores de transcrição.

↳ A dieta com óleo de peixe regula a composição de ácidos graxos da membrana regulando a função monoaminérgica do cérebro. Levando a:

- Melhoras dos processos cognitivos humanos;
- Plasticidade sináptica de uma maneira mais fácil;
- Um aumento na fluidez da membrana sináptica;
- Redução do estresse oxidativo.

↳ A deficiência dietética de ácidos graxos ômega-3 em humanos tem sido associada ao aumento do risco de vários transtornos mentais.

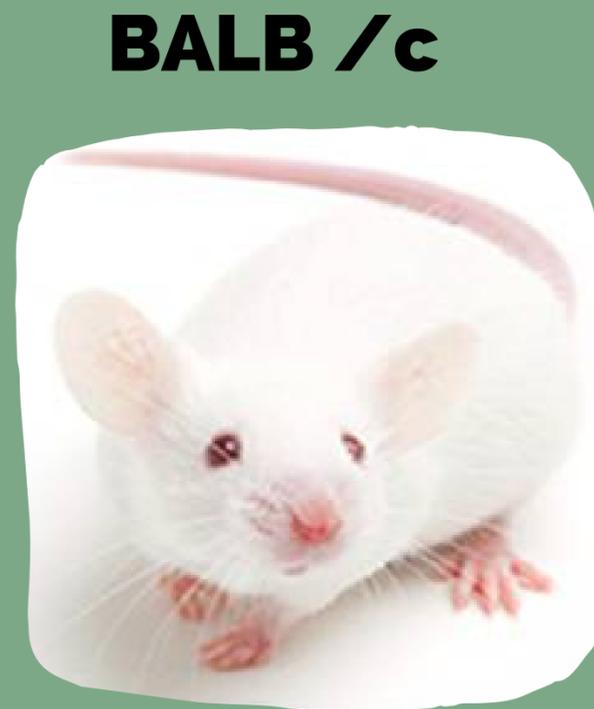
Objetivo e metodologia

↳ **Objetivo:** Comprovar que a diminuição na expressão de RCAN1 com suplementos dietéticos em indivíduos com síndrome de Down representa um tratamento potencial.

↳ **Métodologia**

Camundongos:

- Realizado com camundongos fêmeas das espécies BALB / c e C57BL;
- Mantidos em ciclos claro / escuro de 12 horas com água e alimentos dietéticos especiais;
- Dieta suplementada com e sem óleo de peixe (a partir do acasalamento);



Objetivo e metodologia

Os tratamentos dietéticos:

- Colocados em potes alimentadores de dieta seca;
- Pesados diariamente;
- A saúde geral dos animais e a ingestão de água também foram monitoradas durante os períodos de teste.



→ As dietas consistiram de uma dieta definida para camundongos AIN-93

- Suplementada com nutracêuticos.

→ Dieta de teste:

Suplementadas com óleo de peixe, contendo apenas 2 tipos de gordura (triglicerídeos de cadeia média e óleo de peixe).

Objetivo e metodologia

→ Primeiro estudo com camundongo BALB/c

- Tratados com uma dieta de camundongo definida com nutracêutico.
- 5 filhotes com 4 semanas.

→ Nutracêuticos incluíram:

- Curcumina botânica;
- Quercetina;
- Gingko;
- Alho;
- Extrato de uva;
- Mistura de extratos botânicos Máximo de verduras.

Adicionados a parte, na dieta:

- Óleo de peixe (0,84% ômega-3 final);
- Óleo de milho (utilizado para um controle para óleo de peixe) ou controle não suplementado.

Obs: Após quatro semanas foram coletados os extratos cerebrais.



Objetivo e metodologia

→ Segundo estudo com camundongo BALB/c

- Tratados dieta de camundongo definida com nutracêutico;
- 8 filhotes com idade 4 semanas.

↪ Nutracêuticos incluíram:

- Curcumina botânica;
- Quercetina;
- Gingko;
- Alho;
- Extrato de uva;
- Mistura de extratos botânicos Máximo de verduras.

Adicionados a parte, na dieta:

- Ômega-3 elevado a 1,46%;
- Óleo de soja como controle.

Obs: Após cinco semanas foram coletados os extratos cerebrais.



Objetivo e metodologia

↳ Estudo com camundongo C57BL:

- Tratados com uma dieta de camundongo definida com nutracêutico.
- Filhotes foram alimentados com uma dieta normal (0,13% ômega-3) ou rica em óleo de peixe (1,46% ômega-3) desde a concepção.

Obs: Após seis semanas foram coletados os extratos cerebrais



Objetivo e metodologia

↳ Preparação da proteína e mRNA para análise:

- Os camundongos foram sacrificados.
- Cérebros e baços (quando aplicável) foram cuidadosamente removidos.

↳ Análise da proteína:

A parte esquerda do hemisfério do hipocampo foi sonicado em extração tampão gelado, contendo inibidores de fosfatase e protease e assim centrifugados.

Obs: Para o mRNA, o hipocampo do hemisfério direito e o baço foram homogeneizados em Quiazol.

Objetivo e metodologia

↪ Análises de Western blot:

- Cada extrato foi misturado com um volume igual de 2x sódio tampão de amostra de dodecilsulfato e fervido durante 4 minutos.

→ Separados cortes com quantidades iguais de proteínas, onde foram:

1. Fervidos e submetidos à eletroforese em gel de dodecilsulfato-poliacrilamida;
2. Eletrotransferido para nitrocelulose;
3. Incubados junto do anticorpo primário seguido por um conjugado secundário com peroxidase do anticorpo e desenvolvimento de sinal com substrato quimioluminescente de luz ocidental.

Objetivo e metodologia

→ Reação em cadeia da polimerase em tempo real

- A amostra de mRNA é convertida em DNA complementar.

→ A análise da expressão relativa do gene foi realizada usando o método Livak2- $\Delta\Delta CT$.

- Reação em cadeia da polimerase em tempo real;
- Primers específicos das isoformas Rcan1 e GAPDH.

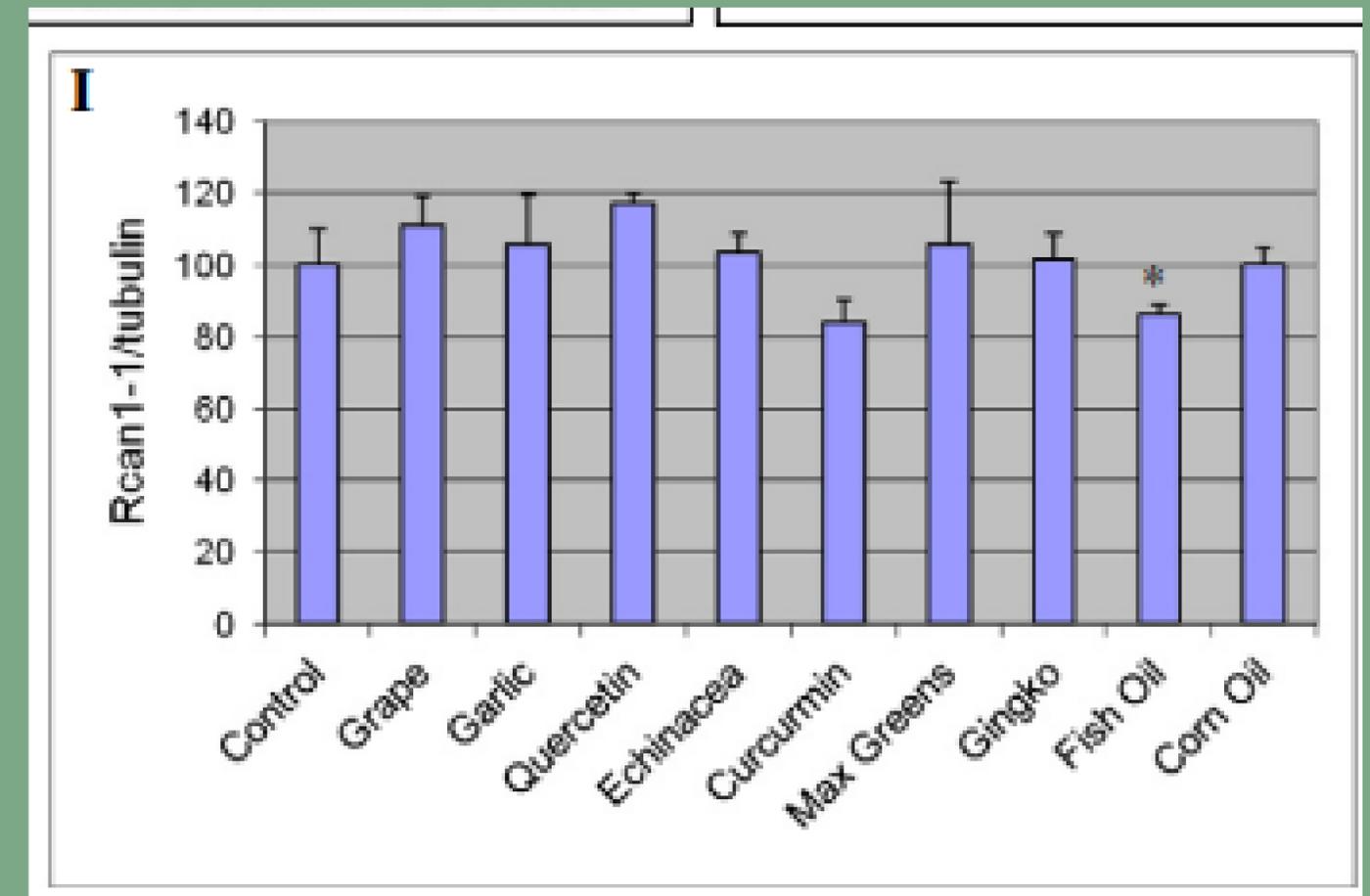
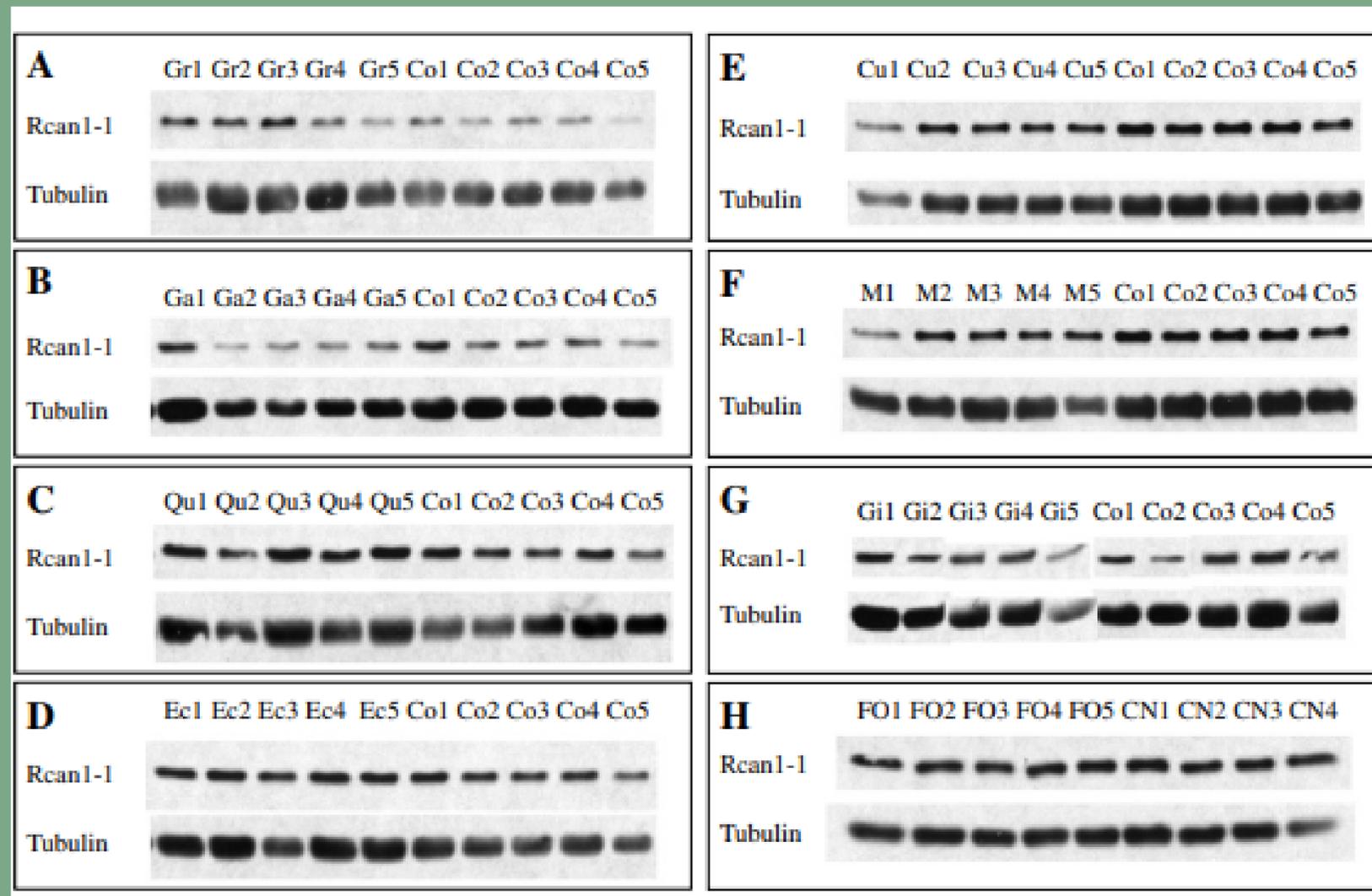
↪ Estatísticas

- Os níveis de proteína foram expressos como porcentagem;
- Os dados são relatados como as médias \pm SEM.

Obs: Há um poder de 80% para detectar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos que é pelo menos tão grande quanto 1,5 nos SDs do grupo.

RESULTADOS

↪ Redução dos níveis da isoforma 1 Rcan1 (com óleo e curcumina).



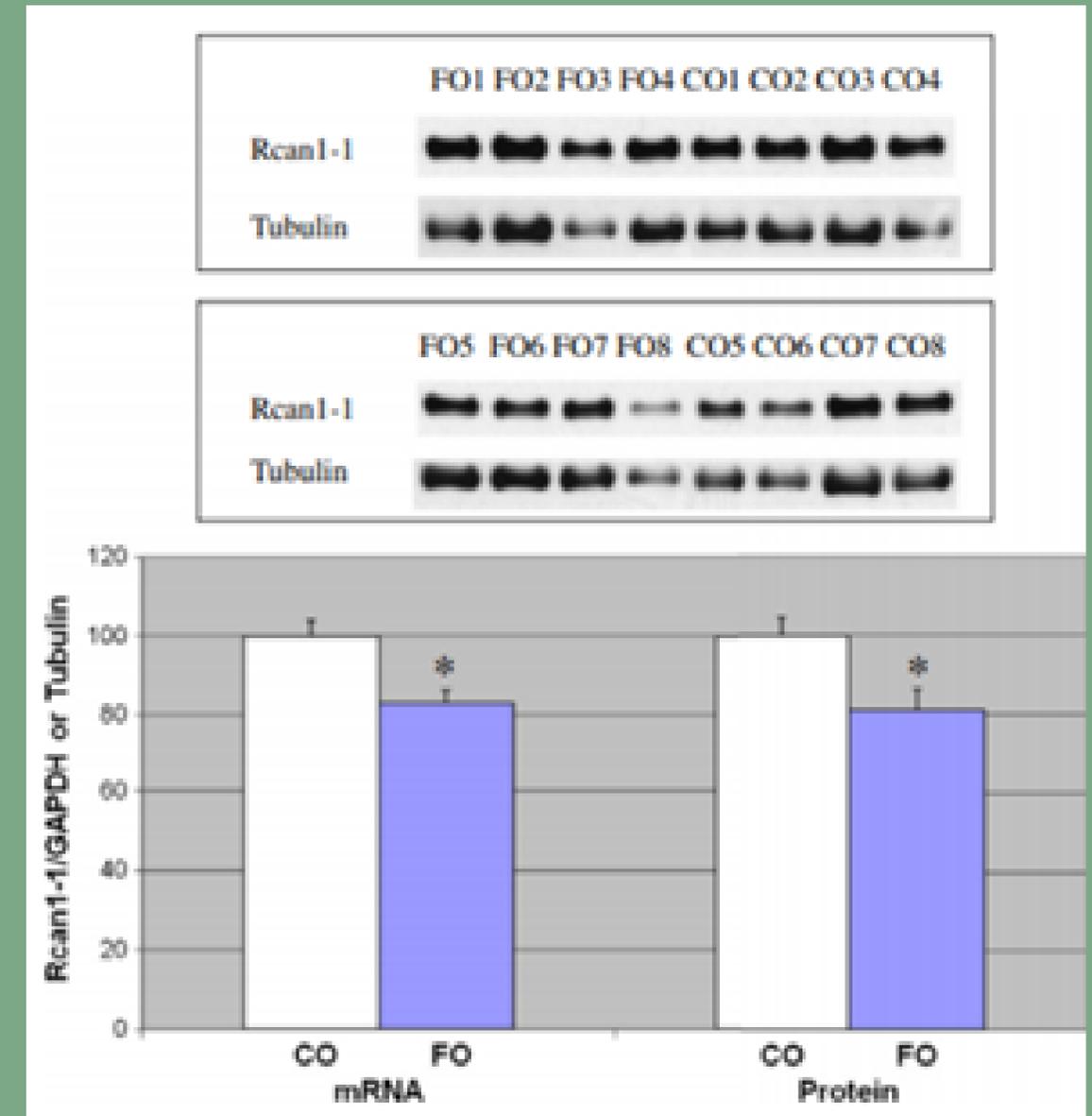
RESULTADOS

Análise bioinformática:

- Estudos sobre mudanças na expressão gênica do hipocampo: redução de mRNA Dscr1(RCAN1).
- Estudos em humanos com suplemento de óleo de peixe: diminuição de 8% de nível mRNA e RCAN1

EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE EM CAMUNDONGOS BALB/C

- Dieta com ômega 3 reduziu os níveis da isoforma 1 do gene Rcan1 e mRNA;
- Diminuição na proteína Rcan1.



EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE EM CAMUNDONGOS C57BL

- Avaliação do efeito da suplementação desde a concepção
 - Óleo normal (0,13% ômega 3) x óleo de peixe (1,46% ômega 3)
- Redução no Rcan1 mRNA no hipocampo: redução no baço



CONCLUSÃO:

O Nutracêutico utilizado no estudo (óleo de peixe com ômega 3) mostrou-se eficaz para suprimir níveis de Rcan1 em camundongos, porém, com grande variabilidade entre organismo, cepa, dieta e possíveis outros fatores.

↳ O estudo trás um **impacto significativo na melhora de funções cognitivas.**

→ **Considerações fundamentais:**

- Independente da quantidade o óleo de peixe, sozinho, aparenta não reduzir esses genes o suficiente
- Uma Possível redução de Rcan1 não ser suficiente para afetar sinalização de NF-AT
- Em próximo estudo, testar hipótese em camundongos com síndrome de Down

ESTUDOS CO-RELACIONADOS

↳ Óleo de peixe e chá verde:

- Combinação que gera reversão significativa de sinalização reduzida de NF-AT.
- Redução de Rcan1-1 com óleo de peixe e redução na atividade da cinase DYRK1A com chá verde induz efeito sinérgico.

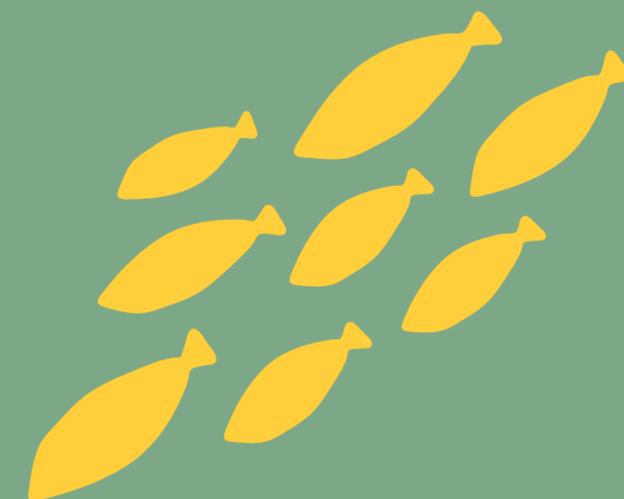


REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Capítulo 8 (pag 356-357). Genética um enfoque conceitua, Benjamin A. Pierce, 5ed.
2. VIOLA, J.P.B. et al . NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. Braz J Med Biol Res, Ribeirão Preto , v. 38, n. 3, p. 335-344, Mar. 2005 . Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100879X2005000300003&lng=en&nrm=iso. access on 23 Oct. 2020.
3. VIOLA, J.P.B. et al . NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. Braz J Med Biol Res, Ribeirão Preto , v. 38, n. 3, p. 335-344, Mar. 2005 . Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100879X2005000300003&lng=en&nrm=iso. access on 23 Oct. 2020.

Referências Bibliográficas

4. BRITO, Francisca Isabel da Silva. Efeito da dieta na expressão adipogénica e nos neurotransmissores monoaminérgicos da corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801). 108p. Universidade de Porto. Porto, 2014.
5. Gómez-Pinilla, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci* 9, 568–578 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrn2421>
6. HTLV-I/II - Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. - Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 1998. 54 p. : il. (Série TELELAB)



Obrigado

