

ANÁLISE DO PAPEL INTRÍNSECO DO RECEPTOR GPR109a NAS FUNÇÕES DE CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS

Palavras-Chave: GPR109a, CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS, PROLIFERAÇÃO

Autores(as):

JULIA WANG JORGE, IB – UNICAMP

HELDER CARVALHO DE ASSIS (co-autor), IB – UNICAMP

Prof. Dr. MARCO AURÉLIO RAMIREZ VINOLO (orientador), IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A microbiota intestinal e sua interação com o sistema imune e outras células do hospedeiro é essencial para a manutenção da homeostase, sendo que alterações nesse balanço estão diretamente ligadas ao aumento da incidência de infecções, inflamações, tumores e doenças imunomediadas. Os metabólitos liberados pela microbiota intestinal interagem com as células da mucosa intestinal e com as células imunes do intestino, desencadeando reações em cascata e influenciando o comportamento dessas células. Dentre esses metabólitos estão os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), produzidos por bactérias que metabolizam fibras alimentares. A presença de AGCCs no lúmen intestinal contribui para reduzir a incidência de inflamações e a prevenção de doenças imunomediadas. Entre os AGCCs, acetato, propionato e butirato interagem com receptores acoplados à proteína G e desencadeiam sinais em células epiteliais, imunes e no tecido adiposo. Embora a maioria dos receptores envolvidos nesse processo seja relativamente bem compreendida, o papel do receptor GPR109A, o qual é ativado por butirato, na regulação do funcionamento do epitélio intestinal ainda é pouco conhecido. Portanto, este projeto tem como objetivo elucidar o papel do receptor GPR109A na função das células intestinais. Para tanto, avaliamos sua expressão gênica nos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio intestinal via análises de bioinformática e o papel desse receptor no desenvolvimento dos organóides.

METODOLOGIA:

- 1) Análises de bioinformática: Dados disponíveis em repositórios internacionais como o NCBI, Human Protein Atlas e CellxGene foram selecionados com base em palavras chaves incluindo “HCAR2”, “intestinal epithelial cells” e “single cell RNA sequencing”. Após a triagem inicial dos

mesmos, selecionamos os melhores *datasets* com base na qualidade e/ou profundidade do sequenciamento e obtivemos um panorama da expressão do receptor HCAR2 (GPR109a) nos tecidos do corpo humano, com foco nos tecidos intestinais.

- 2) Camundongos: Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 e GPR109a^{-/-} (B6.129S6-Cd109tm1Mat) de 8 a 10 semanas de idade. Os camundongos foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) – UNICAMP, e Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCCE) – USP, e foram mantidos no Biotério do Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia (DGEMI) do Instituto de Biologia da UNICAMP. Todos os protocolos foram previamente submetidos à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP nº 6479-1/2024 .
- 3) Organoides intestinais: Os organoides intestinais de camundongos foram obtidos a partir de criptas isoladas do cólon. De modo resumido, 100 a 200 criptas foram ressuspensas em Matrigel sem phenol red (BD Biosciences) acrescido de meio de cultura (1:1), e plaqueadas em placa de 96 poços. As células foram mantidas em meio completo contendo fatores de crescimento. As criptas foram fotografadas após o plaqueamento (dia 0), e nos dias 3 e 5 de cultivo.
- 4) Organoides de células isoladas: Os organoides obtidos de criptas foram dissociados após 5 dias de cultura com o uso de TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) e as células isoladas foram plaqueadas em Matrigel contendo o meio completo. O desenvolvimento dos organóides foi acompanhado pela contagem do total de organóides e mensuração do volume dos mesmos nos dias 0, 3 e 5 após o seu plaqueamento.
- 5) Análises estatísticas: as análises estatísticas são e serão realizadas por meio do programa Prism, sendo eles Ordinary one-way ANOVA, 2-way ANOVA, teste T, e testes de normalidade e log normalidade como o teste de Anderson-Darling e de D'Agostino & Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram coletados dados disponíveis em bancos de dados sobre a expressão do gene HCAR2 em células de tecidos de humanos saudáveis. Em suma, a expressão de HCAR2 detectada em diferentes grupos celulares encontrados no intestino (células epiteliais, neuronais e imunes) é muito baixa, independentemente do sexo e da idade do indivíduo. Entre os tipos celulares, a expressão também é muito baixa, mas ela é consistente e predominante em células imunes como macrófagos, células T e células B. A expressão proteica do gene é majoritariamente baixa ou não detectada ao longo de todos os tecidos do corpo, como indica a Figura 1, e a expressão de RNA nos tecidos do trato digestivo é baixa, quase 0 nTPM (normalized transcriptions per million).

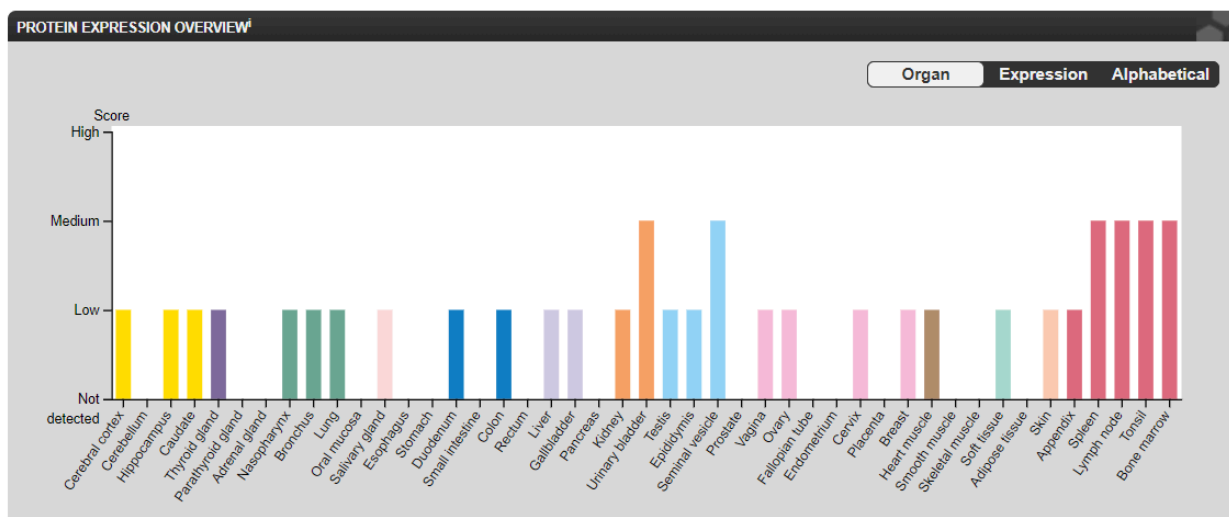


Figura 1: Overview da expressão proteica de HCAR2 nos tecidos humanos (gráfico obtido do site Human Protein Atlas)

Para avaliar o efeito do gene na proliferação das células epiteliais intestinais, foram cultivados organóides formados a partir de criptas do cólon de camundongos com e sem ligantes do receptor, sendo estes o butirato (BT) e o beta-hidroxibutirato (BHB). Foram feitos testes usando criptas do cólon de animais WT (animais que expressam o gene GPR109a) e animais KO (que não expressam o gene GPR109a). Após a normalização em relação ao número de criptas plaqueadas no dia 0, observou-se que tratamentos com BT (concentração 0.5mM) induziram maior formação de organóides tanto no dia 3 quanto no dia 5 (Figura 2) em animais WT, enquanto tratamentos com BHB (concentração 0.5mM) apresentaram menor formação de organóides ou nenhuma diferença em relação ao controle. No entanto, os organóides formados a partir das criptas de animais KO não apresentaram diferença na clonogenicidade entre tratamentos (Figura 2).

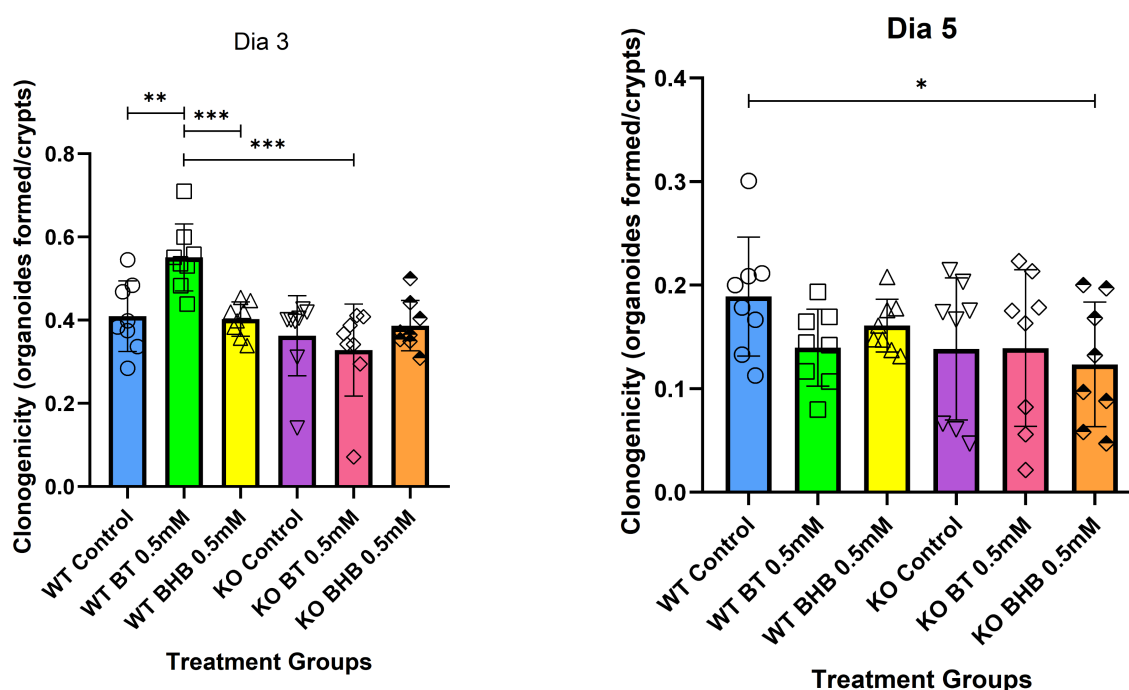


Figura 2: Gráficos de clonogenicidade de organóides formados a partir de criptas de cólon de animais WT e KO, em porcentagem, nos dias 3 (esquerda) e 5 (direita).

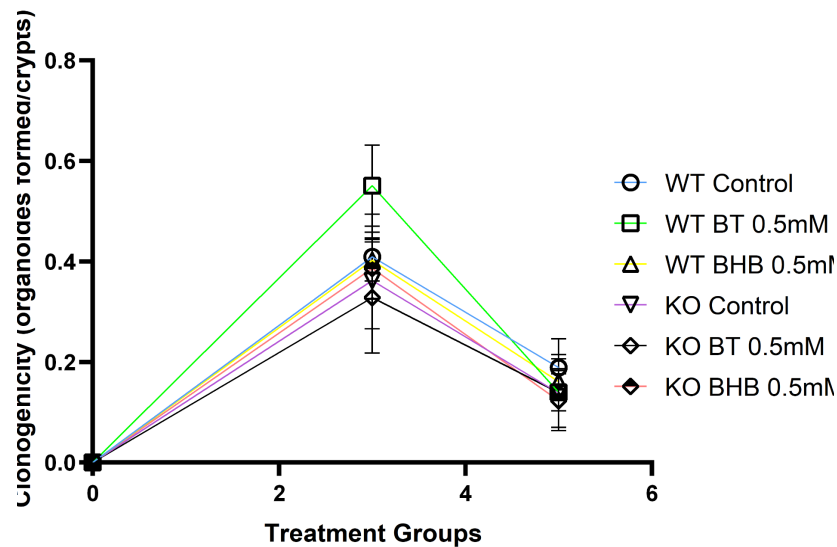


Figura 3: Gráficos de barras de clonogenicidade de organóides formados a partir de criptas de cólon de animais WT e KO, em porcentagem, ao longo dos dias 0 - 5.

CONCLUSÕES:

A expressão do gene HCAR2 é extremamente baixa na grande maioria dos tecidos, incluindo os do trato digestivo, o que indica uma dificuldade em detectá-lo por meio das técnicas de análise de expressão utilizadas. É possível que a expressão de RNA seja reduzida devido à sua produção ser limitada a um período específico do desenvolvimento das células. Após a síntese de uma quantidade determinada do receptor GPR109A, a transcrição poderia ser interrompida, o que explicaria a expressão proteica mais alta em comparação à de RNA. Após o processamento das informações disponíveis em bancos de dados, conclui-se que a expressão do gene é predominante em células do sistema imune.

Em relação a clonogenicidade de organóides de animais WT e KO tratados com ligantes do receptor GPR109a, a ausência do aumento característico da clonogenicidade em grupos KO tratados com butirato indica que o gene HCAR2 está relacionado a proliferação de células epiteliais intestinais e, possivelmente, possui um papel central nessa função, já que a ausência do receptor resultou na eliminação do perfil proliferativo. Em relação ao beta-hidroxibutirato, é possível que a ausência de alteração na proliferação das células tronco do epitélio do cólon esteja relacionada à concentração de BHB utilizada no experimento, sugerindo a necessidade de testar outras condições. Alternativamente, essas células podem ser intrinsecamente resistentes aos efeitos do BHB.

Futuros experimentos utilizando RNA Scope e RNA sequencing devem elucidar mais especificamente quais células dentro das criptas expressam o gene, além de suas posições nas

criptas, e quais genes são afetados pela presença ou ausência do receptor GPR109a. Além disso, concentrações diferentes de BHB serão utilizadas em tratamentos de organóides para confirmar a hipótese previamente proposta.

BIBLIOGRAFIA

1. J. Li et al., An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 32, 834-841 (2014).
2. P. Zhang, Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health. *Int J Mol Sci* 23, (2022)
3. Mann, Elizabeth R., Ying Ka Lam, and Holm H. Uhlig. "Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity." *Nature Reviews Immunology* (2024): 1-19.
4. Ikeda, Takako, et al. "Short-chain fatty acid receptors and gut microbiota as therapeutic targets in metabolic, immune, and neurological diseases." *Pharmacology & therapeutics* 239 (2022): 108273.
5. Ahmed, Kashan, Sorin Tunaru, and Stefan Offermanns. "GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors." *Trends in pharmacological sciences* 30.11 (2009): 557-562.
6. Gong, Yuhong, et al. "G protein-coupled receptor 109A maintains the intestinal integrity and protects against ETEC mucosal infection by promoting IgA secretion." *Frontiers in Immunology* 11 (2021): 583652.
7. Chen, Guangxin, et al. "G protein-coupled receptor 109A and host microbiota modulate intestinal epithelial integrity during sepsis." *Frontiers in Immunology* 9 (2018): 2079.
8. Parodi, Benedetta, et al. "Hydroxycarboxylic acid receptor 2, a pleiotropically linked receptor for the multiple sclerosis drug, monomethyl fumarate. Possible implications for the inflammatory response." *Frontiers in Immunology* 12 (2021): 655212.
9. HUANG, Y. et al. GPR109A partly mediates inhibitory effects of β -hydroxybutyric acid on lung adenocarcinoma cell proliferation, migration and invasion. *Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, v. 43, n. 10, p. 1744-1751, 2023.
10. CHENG, Shan et al. Influence of DL- β -hydroxybutyric acid on cell proliferation and calcium influx. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 2, p. 593-597, 2005.