



**Universidade de Brasília**

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Laboratório de Farmacologia Molecular

**PURIFICAÇÃO DE HISTONAS HUMANAS RECOMBINANTES PARA  
MONTAGEM DO DÍMERO DE HISTONAS H2A:H2B E AÇÃO DE EXTRATO  
LIPÍDICO FECAL DE CAMUNDONGOS, NA FISIOLOGIA CELULAR.**

**NATÁLIA DE AGUIAR MONTENEGRO**

**BRASÍLIA, DF**

**2019**

**NATÁLIA DE AGUIAR MONTENEGRO**

**PURIFICAÇÃO DE HISTONAS HUMANAS RECOMBINANTES PARA  
MONTAGEM DO DÍMERO DE HISTONAS H2A:H2B E AÇÃO DE EXTRATO  
LIPÍDICO FECAL DE CAMUNDONGOS, NA FISIOLOGIA CELULAR.**

**Orientador: Prof. Guilherme Martins Santos**

**Dissertação de mestrado apresentada  
como requisito parcial à obtenção do título  
de Mestre em Patologia Molecular pelo  
Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Molecular da Universidade de Brasília.**

**BRASÍLIA, DF**

**2019**

**NATÁLIA DE AGUIAR MONTENEGRO**

**PURIFICAÇÃO DE HISTONAS HUMANAS RECOMBINANTES PARA  
MONTAGEM DO DÍMERO DE HISTONAS H2A:H2B E AÇÃO DE EXTRATO  
LIPÍDICO FECAL DE CAMUNDONGOS, NA FISIOLOGIA CELULAR.**

**Dissertação apresentada à  
Universidade de Brasília, como  
parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Patologia Molecular, para a  
obtenção do título de Mestre**

**Aprovada em de**

**Profa. Dra. Angélica Amorim Amato – UnB**

**Prof. Dr. Carlos José Albuquerque Brasiliense Pantoja– UnB**

**Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves - UnB**

**Prof. Dr. Guilherme Martins Santos**

**Brasília, DF  
2019**

## **Agradecimentos**

Primeiramente ao Professor Guilherme Santos pela orientação, paciência e todos os ensinamentos

Aos meus pais, Monserrat e Ulisses, que me apoiaram a vida inteira e sem vocês eu não seria nada. Se eu pudesse escolher os pais antes de nascer eu com certeza escolheria vocês. Ao meu irmão Mateus que me apoiou inúmeras vezes.

Aos meus amigos, que sempre estão presentes em minha vida e participaram de todos os desabafos e incertezas durante todo o processo. Obrigada especialmente a Maria, Jessica, Lucas, Susi, Juan, Marina e Pedro.

À Fran e Amanda e que discutiram comigo ciência e outras aleatoriedades e sempre tentaram ao máximo acalmar a minha ansiedade.

À todos colegas de Laboratório. Louise, Henrique, Isadora, Marielly, Simone, Amanda, Manu, Paloma, Sid, Carol, Rilva, Letícia.

À todos os professores do Farmol.

Aos colegas de Grupo, Luís, Vinicius e especialmente ao Kaian, que me achou esquisita a princípio porém acabou se tornando um amigão. Obrigada pela paciência, ensinamentos, risadas e carinho.

À Júlia que me ouviu várias e várias vezes, me deu forças e paciência e muito lanche e abrigo e várias coisas. Você é maravilhosa.

As agências de fomento pelo apoio financeiro no trabalho, CAPES, CNPq e FAP-DF.

## Prefácio

No presente trabalho são apresentados dois projetos realizados durante o período do meu curso de pós-graduação, nível mestrado, (i) purificação de histonas humanas recombinantes para montagem do dímero de histonas H2A:H2B e (ii) ação de extrato lipídico fecal de camundongos na fisiologia celular. primeiramente, apresentarei uma breve introdução geral sobre cromatina e lipídeos de material fecal de camundongos, seguindo para o detalhamento de cada projeto com introdução, Materiais e métodos, resultados e discussão/conclusão. (i) O isolamento de histonas recombinantes e montagem do dímero H2A:H2B são essenciais para o estudo estrutural de nucleossomo e cromatina. Para isto, adotamos estratégias de engenharia genética e bioquímicas, como expressão genética recombinante em *E. Coli* e posterior purificação por cromatografia de troca iônica em presença de Ureia e de filtração em gel. Fortuitamente, obtive êxito nestas duas etapas, obtendo um dímero de H2A:H2B com grau de pureza suficiente para os futuros trabalhos estruturais. (ii) A caracterização da ação do componente lipídico do material fecal de camundongos sobre a viabilidade celular faz-se necessária para a potencial utilização destes extratos no tratamento de diversas doenças metabólicas e como suplementação nutricional. Inicialmente eu purifiquei o componente lipídico das fezes utilizando técnica clorofórmio/metanol. Após a análise do perfil espectrofotométrico das amostras, tratamos diferentes linhagens celulares tumorais, HeLa e HePG2, e não tumoral, MSC (*mesenchymal stem cells*), com estes extratos para observar o efeito sobre a viabilidade celular. Demonstro aqui que os extratos fecais normolipídicos e hiperlipídicos apresentam respostas celulares distintas.

## Resumo

A cromatina é formada por unidades repetitivas de nucleossomo, que é composto pelo octâmero de histonas associado ao DNA. Na primeira parte desse trabalho apresento a purificação de histonas recombinantes humanas para montagem do dímeros de histonas H2A:H2B, com o objetivo de realizar estudos estruturais da cromatina. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 foram expressas por cepa Rosetta PlysS e purificadas por cromatografia de troca iônica. As histonas purificadas individualmente H2A, H2B, H3 e H4 foram bem expressas. A purificação das histonas H2A, H2B e H3 foram bem-sucedidas, apresentaram um grau de pureza suficiente para a montagem do dímero H2A:H2B por cromatografia de exclusão de tamanho. Contudo, a purificação da histona H4 apresentou diversos contaminantes, impossibilitando a montagem do octâmero. Na segunda parte do trabalho, baseado na hipótese de que lipídeos oriundos da microbiota possam ser usados para regular a função celular, realizei a extração lipídica de material fecal de camundongos. A extração de lipídios de material fecal e ração utilizada na dieta de camundongos foi realizada sob dietas hiperlipídicas ou normolipídicas utilizando o método metanol-clorofórmio. Os extratos foram padronizados por espectrofotometria de absorbância UV. Para se observar o efeito dos extratos sobre a viabilidade de três linhagens celulares humanas, de origem tumoral (HepG2 e HeLa) e não tumoral (MSC). Observamos que o extrato normolipídico fecal possui um maior efeito inibitório na viabilidade celular que o extrato hiperlipídico fecal. Além disto, observamos que o extrato lipídico proveniente da dieta apresenta resultados diferentes quando comparado ao proveniente de material fecal. Estes resultados sugerem que metabolitos lipídicos possuem efeitos na viabilidade celular.

**PALAVRAS CHAVE:** Histonas; proteínas recombinantes; nucleossomo; lipídios; Extrato fecal.

## **Abstract**

Chromatin is formed by repeating nucleosome units, which is composed of the histone octamer associated with DNA. In the first part of this work I present the purification of human recombinant histones for the assembly of histone dimers H2A: H2B, in order to perform structural chromatin studies. Histones H2A, H2B, H3 and H4 were expressed by Rosetta PlysS strain and purified by ion exchange chromatography. Individually purified histones H2A, H2B, H3 and H4 were well expressed. Purification of the histones H2A, H2B and H3 were successful, showed a sufficient degree of purity for the assembly of the dimer H2A: H2B by size exclusion chromatography. However, the purification of histone H4 presented several contaminants, making it impossible to mount the octamer. In the second part of the work, based on the hypothesis that lipids from the microbiota can be used to regulate cell function, I performed the lipid extraction of fecal material from mice. The lipid extraction of fecal material and ration used in the diet of mice was performed under hyperlipid or normolipid diets using the methanol-chloroform method. The extracts were standardized by UV absorbance spectrophotometry. In order to observe the effect of the extracts on the viability of three human cell lines, of tumor origin (HepG2 and HeLa) and non-tumoral (MSC) origin. We observed that the fecal normolipid extract has a greater inhibitory effect on cell viability than the fecal hyperlipid extract. In addition, we observed that the lipid extract from the diet presents different results when compared to that from fecal material. These results suggest that lipid metabolites have effects on cell viability.

**KEYWORDS:** Histones; recombinant proteins; nucleosome; lipids; Fecal extract.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens,  
mas em ter novos olhos”.*

*(Marcel Proust)*

1.1.	Sumário	
1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1.	Cromatina .....	1
1.2.	Microbiota .....	2
1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	5
1.1.	Nucleossomo.....	5
1.2.	Histonas .....	6
1.3.	Expressão de Proteínas .....	7
1.4.	Expressão de histonas e reconstituição do nucleossomo .....	8
2.	OBJETIVOS.....	9
2.1.	Objetivo Geral.....	9
2.2.	Objetivos Específicos .....	9
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1.	Reagentes .....	10
3.2.	Equipamentos.....	11
3.3.	Preparo de células competentes .....	11
3.4.	Transformação Bacteriana .....	12
3.1.	Expressão de histonas recombinantes .....	13
3.2.	Purificação de histonas .....	14
3.3.	Cromatografia de troca iônica.....	15
3.4.	Reconstituição dímero de H2A:H2B .....	16
3.5.	Cromatografia por exclusão de tamanho .....	17
4.	RESULTADOS.....	19
4.1.	Purificação de Histonas .....	19
4.2.	Purificação H2A.....	20
4.3.	Purificação H2B.....	21
4.4.	Purificação H3 .....	22
4.5.	Purificação H4 .....	24

4.6.	Recontituição Dímero H2A:H2B .....	26
5.	CONCLUSÃO.....	30
1.	INTRODUÇÃO ESPECÍFICA.....	32
1.1.	Interação Microbiota-Hospedeiro.....	32
1.2.	Lípidios .....	33
1.3.	Metabólitos lipídicos da microbiota.....	34
2.	OBJETIVOS.....	36
2.1.	Objetivo geral .....	36
2.2.	Objetivos específicos.....	36
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1.	Reagentes .....	37
3.2.	Equipamentos.....	37
3.3.	Extração lipídica.....	38
3.4.	Cultivo celular.....	39
3.5.	MTT.....	39
4.	RESULTADOS.....	41
4.1.	Extração lipídica e padronização dos extratos .....	41
4.2.	Viabilidade celular	
4.2.1.	Comparação entre linhagens celulares. ....	42
4.2.1.1.	Extrato Fecal hiperlipídico.....	42
4.2.1.2.	Extrato fecal normolipídico .....	43
4.2.1.3.	Extrato ração hiperlipídico .....	44
4.2.1.4	Extrato ração normolipídico.....	46
4.2.2.	Comparação entre extratos .....	47
4.2.2.1.	HepG2.....	47
4.2.2.2	HeLa .....	48
4.2.2.3.	MSC.....	50
5.	CONCLUSÃO.....	53

6.	REFERÊNCIAS.....	55
----	------------------	----

## Lista de abreviaturas

APS	Persulfato de amônio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
LB	Luria-Bertani
NaCl	Cloreto de Sódio
NCP	<i>Nucleosome Core Particle</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
RPM	Rotações por minuto
SDS- PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
kDa	Kilodaltons
mAU	<i>mili arbitrary unit</i>
UV	Ultra violeta
AGCC	Ácidos Graxos De Cadeia Curta
HDAC	Histone Deacetylase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
LD	<i>Lipid droplet</i>

## Lista de figuras

<b>Figura 1. Compactação hierárquica da cromatina. O DNA está na sua forma livre, se ligando a histonas formando a conformação colar de contas em que está mais relaxada e se tem maior atividade transcricional. Para a formação da fibra de 30 nm em que há baixa atividade transcricional, há o condensamento. A cromatina continua a condensar até formar o cromossomo mitótico Imagem adaptada de Ou et al., 2017 .....</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2 Microbiota intestinal. Expõe a relação entre os micróbios que habitam no hospedeiro e produzem genes. Esses genes são responsáveis pela geração de metabólitos que podem ser utilizados pelo hospedeiro ou pela microbiota. Adaptado de Moya et al., (2016).....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 3. Representação nucleossomo. Coordenadas obtidas de Davey et al., (2002). Representação Obtida com o software PyMol Viewer TM (PDB: 1KX5) ..</b>	<b>5</b>
<b>Figura 4. Representação das histonas. a) Histonas representadas em conformação terciária. b) Domínios de cada histona. Figura adaptada de McGinty et al., (2015) .....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 5. Mapa dos vetores pET 3a. Os plasmídeos utilizados contendo a sequência para a expressão de histonas recombinantes. Representação obtida pelo software SnapGene ViewerTM 4.0.5. ....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 6. Esquema ilustrativo de cromatografia por exclusão de tamanho. A figura demonstra um perfil cromatográfico básico para cromatografias de exclusão de tamanho, A condutividade nessa análise é alta pela alta quantidade de sal no experimento, no primeiro pico, há a eluição de proteínas maiores que o cut-off da coluna, quando está acontecendo a eluição são eluidas proteínas que estão dentro do alcance da coluna. Já um pico na condutividade devido ao aumento de sal presente na amostra. Adaptado de [37].....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 7. Extrato bacteriano das proteínas recombinantes. Observamos aqui a expressão das histonas, entre 12 e 17 kDa,. Gel SDS-PAGE 15%.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 8. Purificação de proteína H2A. A direita perfil cromatográfico mostrando pico em azul, e em verde a concentração do tampão B. A esquerda gel SDS-</b>	

PAGE 15% com as frações correspondentes ao pico, mostrando em destaque a proteína H2A.....	20
Figura 9. Purificação de proteína H2B. A direita perfil cromatográfico mostrando pico em azul, e em verde a concentração do tampão B. A esquerda gel SDS-PAGE 15% com as frações correspondentes ao pico, mostrando em destaque a proteína H2B.....	22
Figura 10. Purificação de proteína H3. A direita perfil cromatográfico mostrando pico em azul, e em verde a concentração do tampão B. A esquerda gel SDS-PAGE 15% com as frações correspondente ao pico, mostrando em destaque a proteína H3. ....	23
Figura 11. Purificação de proteína H4. A cima perfil cromatográfico mostrando pico em azul, e em verde a concentração do tampão B. Abaixo gel SDS-PAGE 15% com as frações correspondente ao pico, mostrando em destaque a proteína H4. ....	25
Figura 12. Amostra injetada reconstituição dímero. Como controle, a esquerda no gel está o octâmero proveniente de eritrócitos de galinha. SDS-PAGE 15%. ....	27
Figura 13. Cromatografia de exclusão de tamanho. Acima perfil cromatográfico da separação molecular, as frações de 9 a 13 são referentes ao primeiro pico apresentado, as frações de 31 a 40 são referentes ao segundo pico apresentado, em que se encontra o dímero e os últimos picos não foram representados por não apresentarem bandas de alta intensidade SDS-PAGE 15%.....	28
Figura 14. Gel SDS PAGE 15% para confirmação dos complexos formados na reconstituição do dímero H2A:H2B Os complexos H3:H2A estão na altura dos referente a essas proteínas quando comparados ao octâmero de histonas utilizado para controle, enquanto o dímero está presente na mesma altura das proteínas H2A e H2B.....	29
Figura 15. Papeis biológicos celulares exercidos por lipídios. Adaptado de Oresic et al., 2008.....	33
Figura 16. Processo de extração lipídica por metanol:clorofórmio. ....	39
Figura 17. Mensurações espectrofotometricas das regiões de oxidação dos extratos para a padronização.....	42

<b>Figura 18. Efeito do extrato hiperlipídico sobre viabilidade de diferentes linhagens celulares. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA (<math>p &lt; 0.05</math>) no software PrismGraph. ....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 19. Efeito do extrato normolipídico sobre viabilidade de diferentes linhagens celulares. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA (<math>p &lt; 0.05</math>) no software PrismGraph .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 20. Efeito do extrato hiperlipidico proveniente de ração sobre viabilidade de diferentes linhagens celulares. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA (<math>p &lt; 0.05</math>) no software PrismGraph .....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 21. Efeito do extrato normolipidico proveniente de ração sobre viabilidade de diferentes linhagens celulares. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA (<math>p &lt; 0.05</math>) no software PrismGraph .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 22 Efeitos da aplicação de extratos sobre a célula Hep G2. Diferenças significativas entre extratos estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA (<math>p &lt; 0.05</math>) no software PrismGraph .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 23. Efeitos da aplicação de extratos sobre a célula HeLa. Diferenças significativas entre extratos estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA (<math>p &lt; 0.05</math>) no software PrismGraph .....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 24. Efeitos da aplicação de extratos sobre a célula MSC. Diferenças significativas entre extratos estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e</b>	

<b>extratos. Análises feitas por two-way ANOVA (<math>p &lt; 0.05</math>) no software PrismGraph</b> .....	<b>50</b>
<b>Figura 25. Efeitos da aplicação de extratos fecais em todas as linhagens na maior concentração. Diferenças significativas entre extratos estão representadas por asteriscos Análises feitas por two-way ANOVA (<math>p &lt; 0.05</math>) no software PrismGraph.....</b>	<b>52</b>

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1. Reagentes utilizados. ....</b>	<b>10</b>
<b>Tabela 2. Equipamentos utilizados.....</b>	<b>11</b>
<b>Tabela 3. Soluções para os tampões utilizados na purificação de histonas .....</b>	<b>15</b>
<b>Tabela 4. Tampões utilizados para cromatografia iônica.....</b>	<b>16</b>
<b>Tabela 5. Tampões utilizados para montagem do dímero. ....</b>	<b>17</b>
<b>Tabela 6. Perfil de cromatografia da histona H2A. ....</b>	<b>21</b>
<b>Tabela 7. Perfil de cromatografia da histona H2B. ....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 8. Perfil de cromatografia da histona H3.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 9. Perfil cromatográfico de purificação da proteína H4.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 11. Lista de Reagentes utilizados .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabela 12. Lista de equipamentos utilizados .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabela 13. Composição ração hiperlipídica e normolipídica. Valores referentes a 1kg de dieta. Fonte: PRAGSOLUÇÕES Biociências® .....</b>	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Cromatina

O material genético de eucariotos está organizado na conformação de cromatina, que além de manter todo o material genético dentro do núcleo, a sua conformação permite o acesso da maquinaria transcricional basal da célula ao DNA regulando assim a transcrição, replicação e reparo (Venkatesh e Workman, 2015b).

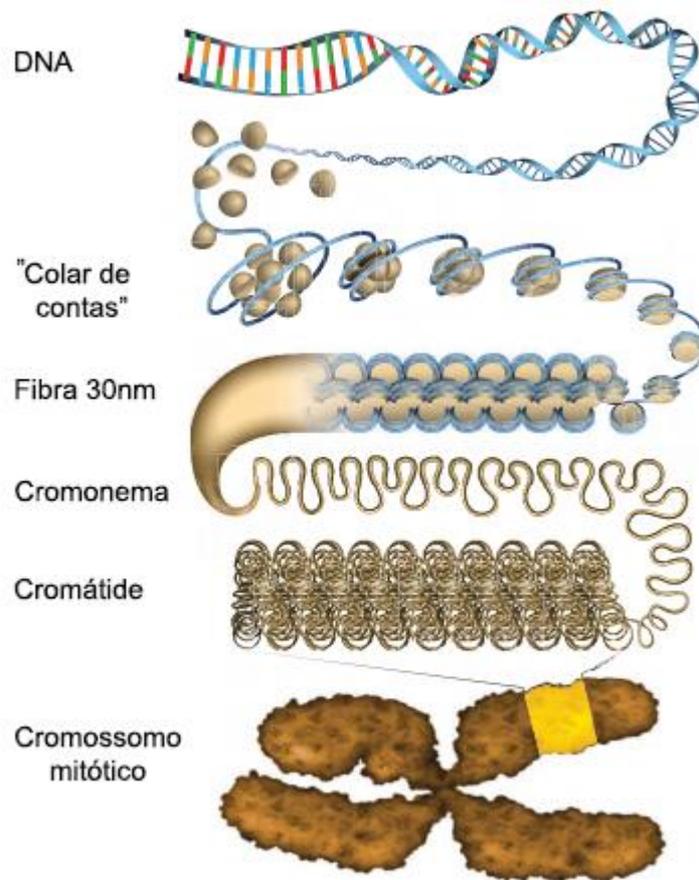
A cromatina segue uma ordem hierárquica de compactação (Fig 1) em que se tem inicialmente o DNA livre, que ao se enovelar em um octâmetro de histonas (H2A, H2B, H3 e H4), realizando em torno de 1,7 voltas, formando um complexo chamado de nucleossomo, sendo esse a unidade básica da composição da cromatina (Luger, K. *et al.*, 1997).

A cromatina pode se apresentar no estado de eucromatina, ou colar de contas, e de heterocromatina. A abertura e fechamento da arquitetura da cromatina é um processo dinâmico que participará da regulação da transcrição gênica (Ou *et al.*, 2017).

A eucromatina é o estado onde a cromatina encontra-se mais acessível, expondo o DNA à fatores de transcrição e maquinaria transcricional basal. Este livre acesso possibilita o aumento dos níveis transcricionais celulares. Por sua vez, a heterocromatina é o estado mais condensado, em que o acesso ao DNA é dificultado, diminuindo assim a transcrição (Grewal e Jia, 2007).

A heterocromatina pode ser dividida ainda em constitutiva e facultativa. A constitutiva é formada nas regiões dos telômeros, centrômeros e em elementos repetitivos (Dillon, 2004) enquanto a facultativa é regulada e está ligada a diferenciação celular e morfogênese (Trojer e Reinberg, 2007).

Apesar da associação da heterocromatina com a repressão gênica, o relaxamento da cromatina não é inteiramente essencial para promover a expressão gênica (Hu *et al.*, 2009).



**Figura 1. Compactação hierárquica da cromatina.** O DNA está na sua forma livre, se ligando a histonas formando a conformação colar de contas conformação relaxada e de maior atividade transcricional. Para a formação da fibra de 30 nm em que há baixa atividade transcricional, há o condensamento. A cromatina continua a condensar até formar o cromossomo mitótico Imagem adaptada de Ou et al., 2017

## 1.2. Microbiota

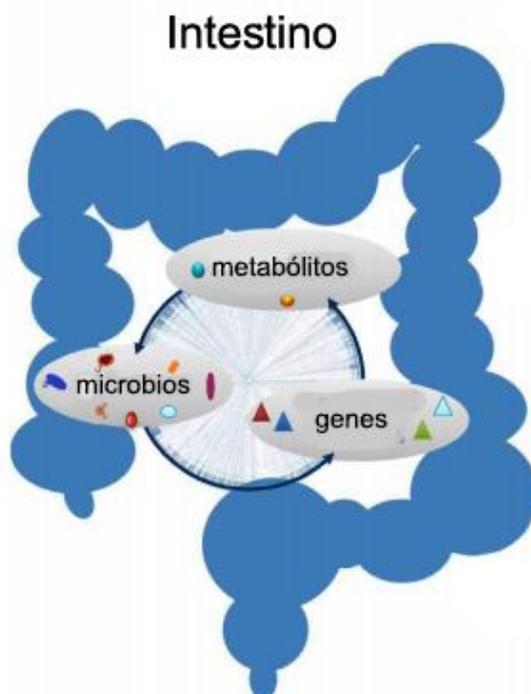
A microbiota humana é composta por diversos organismos, como archaeae, bactérias, fungos, vírus e bacteriófagos. Pode ser encontrada em diversas regiões do organismo, como trato vaginal, digestivo, respiratório, urinário e pele (Cani *et al.*, 2019). A microbiota coevoluiu com seu hospedeiro (Ley *et al.*, 2008), apresentando importantes papéis biológicos no indivíduo, afetando vias metabólicas, inflamatórias e endócrinas (O'hara e Shanahan, 2006).

A microbiota pode diferir de indivíduo para indivíduo, já que começa a ser adquirida nos primeiros estágios da vida com o contato com a mãe e é modulada,

ao longo do tempo, por fatores extrínsecos, como mudanças na dieta, ambiente, exercícios, medicamentos (Gagnière *et al.*, 2016).

A microbiota exerce papéis fisiológicos no hospedeiro, como por exemplo: proteção a patógenos (Bäumler e Sperandio, 2016), regulação da imunidade (Gensollen *et al.*, 2016), modulação do epitélio intestinal (Natividad e Verdu, 2013) e aquisição de energia (Den Besten *et al.*, 2013). Entretanto, pode acontecer a disbiose, que está ligada com a alteração da microbiota, o que leva a modulação de suas funções. A disbiose faz parte de diversas patologias (Thursby e Juge, 2017).

Para o estudo da microbiota, existem duas estratégias a *bottom-up* e a *top-down*. A abordagem *bottom-up* estuda como a microbiota determina a função, enquanto a técnica *top-down* estuda como a função determina a microbiota (Moya e Ferrer, 2016). Independente da forma utilizada, a microbiota possui organismos, que vão produzir metabólitos e esses podem influenciar o hospedeiro ou a própria microbiota (Fig 2.) (Moya e Ferrer, 2016).



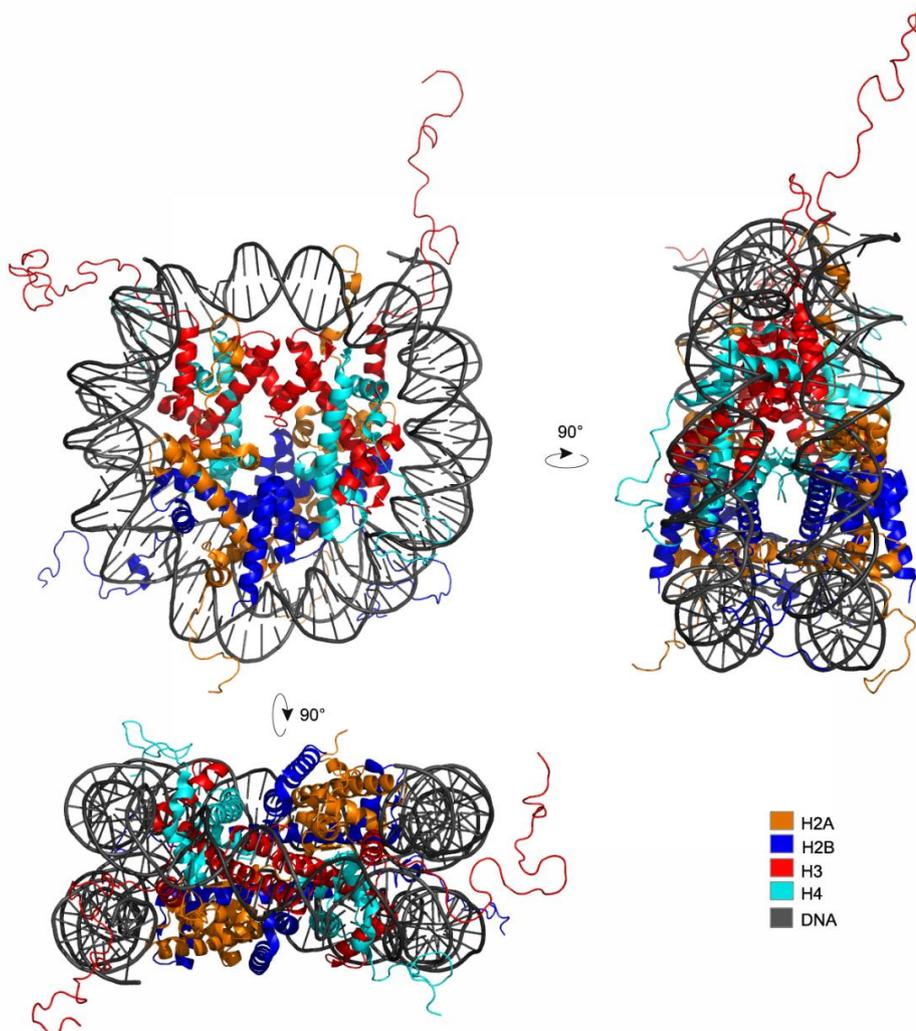
**Figura 2 Microbiota intestinal.** Expõe a relação entre os micróbios que habitam no hospedeiro e seus genes. Esses genes são responsáveis pela geração de metabólitos que podem ser utilizados pelo hospedeiro ou pela microbiota. Adaptado de Moya et al., (2016).

**CAPÍTULO 1 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE HISTONAS HUMANAS  
RECOMBINANTES E MONTAGEM DO DÍMERO DE HISTONAS H2A:H2B**

## 1. INTRODUÇÃO ESPECÍFICA

### 1.1. Nucleossomo

A partícula central do nucleossomo (*Nucleosome core particle- NCP*) (Fig. 3) é a unidade básica formadora da cromatina, além de ser a primeira barreira para a maquinaria transcricional basal celular e primeira forma de compactação do material genético (Zhu e Li, 2016). Esta é formada por quatro histonas H2A, H2B, H3 e H4, que são proteínas básicas, carregadas positivamente, o que possibilita a interação de alta afinidade com o DNA, que possui carga negativa.



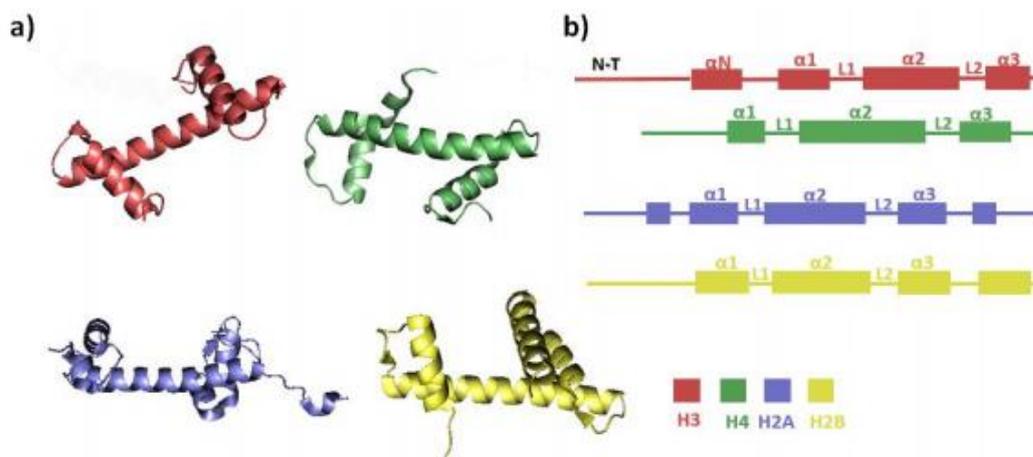
**Figura 3. Representação nucleossomo.** Coordenadas obtidas de Davey et al., (2002). Representação Obtida com o software PyMol Viewer TM (PDB: 1KX5)

No nucleossomo, histonas apresentam-se com dois dímeros de H2A:H2B e um tetrâmero de H3:H4, formando um octâmero onde o DNA se enovela com 1,7 volta, utilizando 145 a 147 pares de base (Luger, K. *et al.*, 1997). O nucleossomo é uma estrutura conservada ao longo das espécies, sendo encontrada em archaeae e até organismos eucariotos mais complexos (Mattioli *et al.*, 2017).

A interação entre DNA e proteínas causa impedimento estérico para a ação de nucleases e restringe interações que outros fatores poderiam realizar (Cutter e Hayes, 2015). É importante ressaltar que, assim como a cromatina, o nucleossomo também é dinâmico, por exemplo, o DNA pode rapidamente desfazer e refazer as ligações com o octâmero permitindo a acessibilidade de determinados fatores de ligação do DNA (Anderson e Widom, 2000).

## 1.2. Histonas

As histonas são proteínas básicas com carga residual positiva devido à grande quantidade de resíduos de aminoácidos lisina e arginina (Fazary *et al.*, 2017). Possuem todas um domínio comum de 3  $\alpha$ -hélices, separadas por loops facilitando a dimerização entre H2A:H2B e H3:H4, após a formação desses dímeros, é formado um novo loop, onde o DNA irá interagir (Venkatesh e Workman, 2015a).



**Figura 4. Representação das histonas.** a) Histonas representadas em conformação terciária. b) Domínios de cada histona. Figura adaptada de McGinty et al., (2015)

São compostas por duas porções, uma que é organizada na forma de estruturas definidas e outra na porção amino terminal que é desordenada, sendo essa chamada de cauda (Fig.4) (Kouzarides, 2007). A Cauda possui funções para a estabilização do nucleossomo. Caudas da H2A, H3 e H4 possuem função para a formação de cromatina mais condensada (Dorigo *et al.*, 2004) (Sperling e Grunstein, 2009) (Gordon *et al.*, 2005), enquanto a H2B é requerida para a condensação do cromossomo.

A região amino terminal pode sofrer diversas modificações pós-traducionais, que influenciam na cromatina de forma a modificar sua compactação ou acessibilidade (Lawrence *et al.*, 2016). Diversas modificações nas histonas já foram descritas, como por exemplo: acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação (Kouzarides, 2007).

Além disso, existem histonas variantes que podem diferir em poucos aminoácidos ou em um domínio a mais que as canônicas. As variantes são cruciais para aumentar a regulação fina da expressão gênica, estando presentes em etapas específicas do ciclo celular (Venkatesh e Workman, 2015a).

### **1.3. Expressão de Proteínas**

Nos anos 70 começou-se a realizar expressão de peptídeos e proteínas em organismos hóspedes (Marston, 1986). Isso possibilitou o avanço da expressão de proteínas heterólogas, que podem ser produzidas a partir de organismos alternativos como bactérias, leveduras, células de inseto e de mamíferos, controladas por um promotor que pode ser induzido ou contínuo (Schumann e Ferreira, 2004).

Algumas aplicações importantes da produção dessas proteínas são: imunização, estudos bioquímicos, estudos estruturais, uso terapêutico e desenvolvimento biotecnológico (Schumann e Ferreira, 2004). As proteínas recombinantes expressas em um sistema simples, por exemplo *E.Coli*, podem apresentar a vantagem de não terem marcações pós-traducionais, o que leva a uma maior uniformidade do estudo (Marston, 1986).

Além disto, a utilização do sistema de expressão em bactérias possui diversas vantagens, entre elas a rápido crescimento celular e o baixo custo. A

*Escherichia coli* é amplamente utilizada, esta possui diferentes cepas com diferentes funções, por exemplo: BL21, Origami, Rosetta (Terpe, 2006).

Todas as cepas possuem modificações para determinada propriedade que se deseja da expressão, a BL21 apresenta deficiência em proteases, a cepa Origami possui facilidade em realizar ligações dissulfeto e a Rosetta, que é uma derivação da cepa BL21, possui modificações para codificar aminoácidos raros para a *E. coli*, obtendo assim, aumento para a expressão de proteínas recombinantes de organismos eucariontes (Terpe, 2006).

#### **1.4. Expressão de histonas e reconstituição do nucleossomo**

A utilização da técnica de expressão proteica em bactérias, em 1997 obteve-se a primeira estrutura de alta resolução de um nucleossomo proveniente de histonas recombinantes do organismo *Xenopus laevis* (Luger, Karolin *et al.*, 1997).

A partir de então, vários estudos na área de cromatina foram realizados com histonas recombinantes provenientes de diversos organismos, como, *Drosophila melanogaster* (Zhou *et al.*, 2019) , *Homo sapiens* (Tanaka *et al.*, 2004) e *X. laevis* (Marabelli *et al.*, 2019).

O nucleossomo está envolvido no processo de regulação gênica. Dessa forma, a expressão de histonas recombinantes humanas *in vitro* permite o estudo desse complexo e possíveis interações moleculares entre o nucleossomo e outras moléculas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Purificar histonas recombinantes humanas e montagem do dímero H2A:H2B para estudos estruturais do nucleossomo e cromatina.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Expressão de histonas;
- Purificação cromatografia de troca iônica;
- Montagem do Dímero H2A:H2B por diálise e cromatografia de exclusão de molecular.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Reagentes

Para a realização desse trabalho foram utilizados os reagentes descritos na tabela 1.

**Tabela 1. Reagentes utilizados.**

<b>Reagente</b>	<b>Fabricante</b>
Ácido acético	Sigma Aldrich Co., EUA
Ácido Clorídrico	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Ampicilina	Sigma Aldrich Co., EUA
Bromofenol	Merck, ALE
Cloranfenicol	Sigma Aldrich Co., EUA
Cloreto de guanidina	Sigma Aldrich Co., EUA
Cloreto de Sódio	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
Coomassie blue	Merck, ALE
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma Aldrich Co., EUA
Ditiotreitol (DTT)	GE Healthcare, UK
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	Sigma Aldrich Co., EUA
EDTA	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
Extrato de levedura	Neogen Corporation, EUA
Glicerol	Sigma Aldrich Co., EUA
Glicina	Sigma Aldrich Co., EUA
Hidróxido de Sódio	Héxis, BRA
Metanol	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Persulfato de amônio (APS)	Bio-rad, EUA
PIC (Protease Inhibitos cocktail)	Sigma Aldrich Co., EUA
PMSF	Sigma Aldrich Co., EUA
Poliacrilamida	Sigma Aldrich Co., EUA
TEMED	Sigma Aldrich Co., EUA
Triptona	Neogen Corporation, EUA
Tris	Promega, EUA
Triton X-100	Sigma Aldrich Co., EUA
Ureia	Sigma Aldrich Co., EUA
$\beta$ -mercaptoetanol	Sigma Aldrich Co., EUA
Rosetta pLysS	Merck, ALE

Coluna HiTrap Q FF	GE Healthcare Life Science, UK
Coluna HiTrap SP FF	GE Healthcare Life Science, UK
Coluna HiTrap Superdex 200 26/60	GE Healthcare Life Science, UK

---

### 3.2. Equipamentos

Para a realização desse trabalho foram utilizados os equipamentos descritos na tabela 2.

**Tabela 2. Equipamentos utilizados**

<b>Equipamento</b>	<b>Fabricante</b>
Balança analítica	Shimadzu do Brasil, BRA
Balança semi-analítica	Sartorius, ALE
Banho-maria	Braun Biotech International, ALE
Centrifuga de microtubos	Hermle, ALE
Espectrofotômetro UV-Vis	Shimadzu do Brasil, BRA
FPLC- ÄKTA™ Pure	GE Healthcare Life Sciences, UK
Homogeneizador circular de tubos	Taiyo Co., Ltda, JAP
pHmetro	Kasvi, BRA
Shaker	New Brunswick Scientific, EUA
Sonicador	Sonics, EUA
Fotodocumentador Amersham Imager 600	GE Healthcare Life Sciences, UK
Aparato de eletroforese	Bio-rad, EUA

### 3.3. Preparo de células competentes

O preparo de células competentes por  $\text{CaCl}_2$  com choque térmico foi realizado de acordo com protocolo estabelecido por Chung e Miller (1993) e modificado pelo Laboratório de Farmacologia Molecular. Esse método faz com que a bactéria tenha maior facilidade para incorporar o DNA presente a sua volta.

Foram inoculadas 10uL da cepa modificada de Rosetta™(DE3)pLysS em meio contendo cloranfenicol a concentração de 20ng/ml em placa contendo meio Luria Bertani (LB) e ágar, uma vez que essa cepa apresenta resistência ao antibiótico, dessa forma, pela técnica de esgotamento, estabelece-se uma colônia pura da cepa.

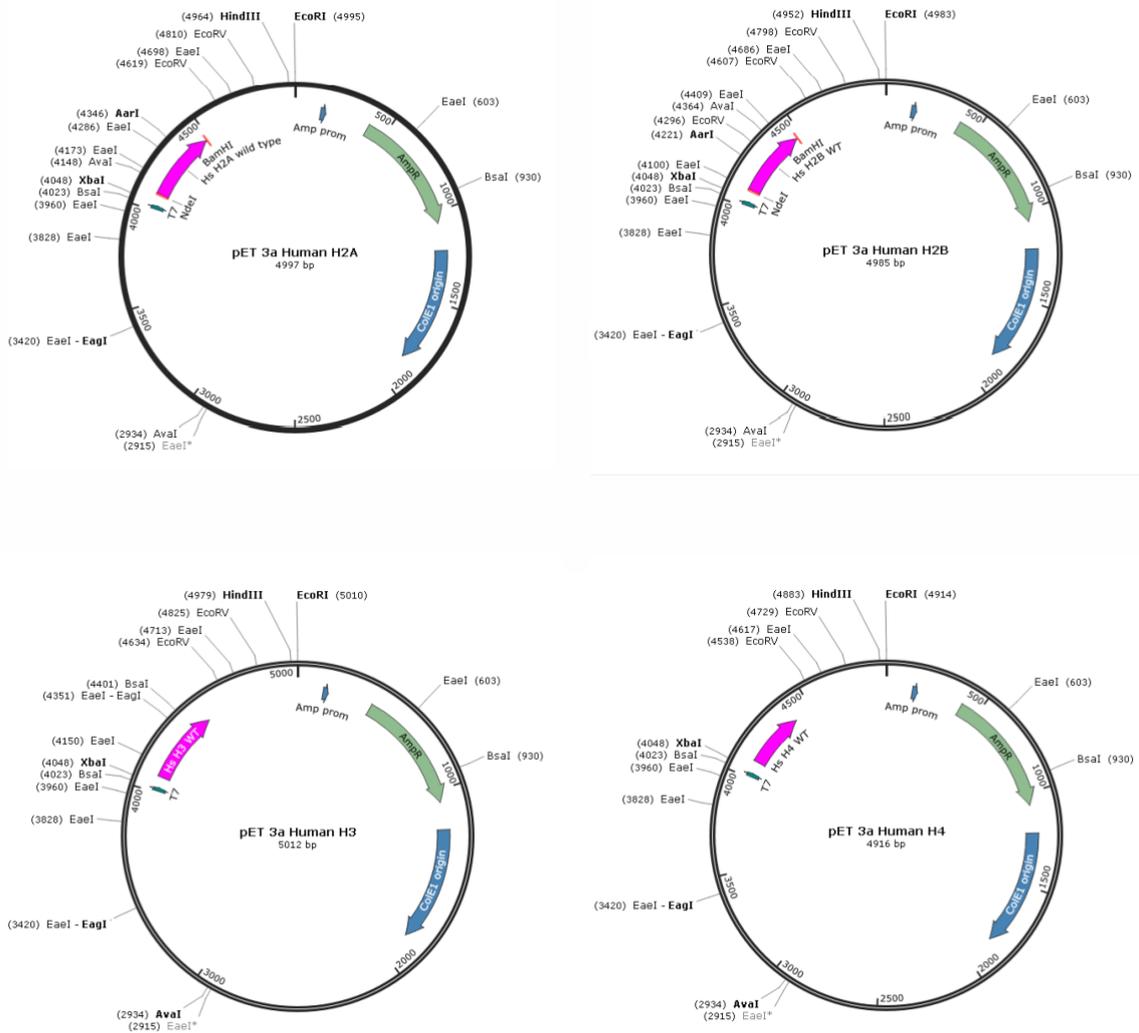
Uma colônia foi isolada e transferida para 5 ml de meio LB contendo cloranfenicol 20ng/ml, em *shaker* a 150 rpm e 37°C durante período *overnight*. Após esse período, 3 ml foram transferidos para 100mL meio LB suplementado com antibiótico. Ao atingir densidade óptica (OD) em 600nm de 0.4/0.5 as células foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min. O pellet foi solubilizado em solução de 50 mM CaCl<sub>2</sub> e incubado em gelo durante 15 min. As células foram centrifugadas novamente nos mesmos parâmetros anteriores e o pellet foi novamente solubilizado em 50mM CaCl<sub>2</sub> e glicerol para posterior uso.

### **3.4. Transformação Bacteriana**

A metodologia de transformação bacteriana utilizada foi a de choque térmico em células quimicamente competentes por CaCl<sub>2</sub> segundo protocolo de Sambrock *et al.*, (2001) padronizado pelo Laboratório de Farmacologia Molecular. A transformação bacteriana introduz um DNA exógeno na bactéria

Em 50uL de células competentes da cepa *Rosetta plyss* adicionou-se 1µg de DNA plasmidial, após homogeneização, as células foram incubadas durante 5 minutos em gelo. O choque térmico foi realizado ao se retirar a solução do gelo e incubar durante 1,5 minutos a 42°C em banho maria e posteriormente novamente durante 5 minutos em gelo. Para recuperação das células a solução foi solubilizada em 500uL de meio LB e incubada durante 1 hora a 37°C.

Após incubação, as células foram inoculadas em meio ágar LB contendo ampicilina 100ug/ml, já que o plasmídeo pET 3<sup>a</sup> (Fig. 5), em que estão os genes que codificam as histonas, confere resistência a esse antibiótico por conter também o gene da β-lactamase em seu construto.



**Figura 5. Mapa dos vetores pET 3a.** Os plasmídeos utilizados contendo a sequência para a expressão de histonas recombinantes. Representação obtida pelo *software SnapGene Viewer™ 4.0.5*.

### 3.5. Expressão de histonas recombinantes

A partir das cepas transformadas, uma colônia isolada foi coletada e transferida para 5 ml de meio LB suplementado com ampicilina 100ug/ml e mantidas em *shaker* a 150 rpm, 37°C, durante 8 horas. Após crescimento bacteriano, 5 ml foram transferidos para 1 L de meio de cultura 2xTY suplementado com ampicilina 100ug/ml, a 150 rpm, 37°C, durante período *overnight*.

As bactérias foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm durante 20 minutos. Uma amostra do extrato bacteriano foi recolhida e solubilizada em água a fim de verificar a super expressão das proteínas recombinantes de interesse. O extrato foi analisado por gel SDS-PAGE 15% e o pellet foi armazenado a -20°C para posterior purificação.

### **3.6. Purificação de histonas**

A primeira etapa para purificação das histonas constitui na lise celular e purificação dos corpos de inclusão. Para isso, o pellet de bactérias previamente congelado foi solubilizado em tampão de lise (Tab, 3). Posteriormente a solução passou por processo de sonicação (4°C, pulsos de 1 segundo seguido de intervalo de 1 segundo amplitude de 50, durante 3 minutos).

Posteriormente, a solução foi centrifugada a 4°C, durante 30 min, a 12000 rpm, o pellet foi então solubilizado em tampão de lise contendo 1% de Triton X-100. Esse processo foi repetido duas vezes. E em seguida o pellet foi solubilizado em tampão de lise sem triton, seguindo as mesmas condições de centrifugação.

Subsequentemente, o pellet foi solubilizado em DMSO e incubado durante 30 min a temperatura ambiente. Os corpos de inclusão foram então extraídos por meio de tampão desnaturante (Tab. 3) e levados a agitador circular durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para a retirada da guanidina (tampão desnaturante) foram feitas 3 diálises em tampão de ureia. A primeira troca de tampão de diálise (Tab. 3) ocorreu após 1 hora, a segunda após 3 horas e a terceira foi realizada durante período overnight.

**Tabela 3. Soluções para os tampões utilizados na purificação de histonas**

<b>Tampão</b>	<b>Componentes</b>
Tampão de Lise	50 mM Tris pH 7,6 0,1 M NaCl 1 mM EDTA 5 mM $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 mM PMSF 500 $\mu$ L Inibidor de proteáse 2 ml Triton X-100
Tampão desnaturante	6 M Cloreto de Guanidina 20 mM Tris pH 7,6 5 mM DTT
Tampão de diálise	7 M Ureia 0,1 M NaCl 1mM EDTA 5 mM $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 PMSF 10mM Tris pH 8,0

### **3.7. Cromatografia de troca iônica**

A cromatografia de troca iônica consiste na afinidade da amostra à coluna que possui uma resina carregada positivamente (coluna aniônica) ou negativamente (coluna catiônica). Quando a amostra consegue se ligar à resina da coluna elas ficam retidas até a passagem do tampão contendo alta concentração de sal, o que levará a uma competição pela ligação na coluna, eluindo assim as moléculas da coluna.

Após dialisadas, as amostras foram filtradas e injetada no equipamento ÄKTA™ Pure (GE Healthcare Life Sciences), em que as colunas HiTrap Q FF e HiTrap SP FF (aniônica e catiônica, respectivamente) já estavam conectadas e equilibradas em tampão A contendo 10% para H2A ou H2B e 20% para H3 e H4 de tampão B. A coluna aniônica é conectada ao sistema para retirada de possíveis contaminantes proteicos com carga negativa.

Após injetadas, as amostras foram recolhidas em frações de 2mL-4mL e foi feito eletroforese SDS-PAGE 15% para confirmação das frações. Após análise do gel, foram unidas as frações próximas que continham a proteína de interesse o mais pura possível e foram novamente dialisadas em tampão de água milli Q, agora para retirada de ureia.

A diálise foi feita com três trocas. A primeira durante período *overnight*, segunda durante 8 horas e terceira também por período *overnight*. Subsequentemente as amostras foram liofilizadas e estocadas em -20°C para posterior uso.

**Tabela 4. Tampões utilizados para cromatografia iônica.**

<b>Tampão A</b>	<b>Tampão B</b>
7 M Ureia	7 M Ureia
1 mM EDTA	1 mM EDTA
10 mM Tris pH 8,0	10 mM Tris pH 8,0
1 mM DTT	1 mM DTT
0,2 mM PMSF	0,2 mM PMSF
	1 M NaCl

### **3.8. Reconstituição octâmero e dímero de H2A:H2B**

Após liofilizadas todas proteínas purificadas (H2A, H2B, H3 e H4), foram solubilizadas com água milli Q no menor volume possível, suas concentrações foram medidas no aparelho *nanovue*, no comprimento de onda de 280nm e partindo do coeficiente de extinção disponível na literatura foi realizado o cálculo.

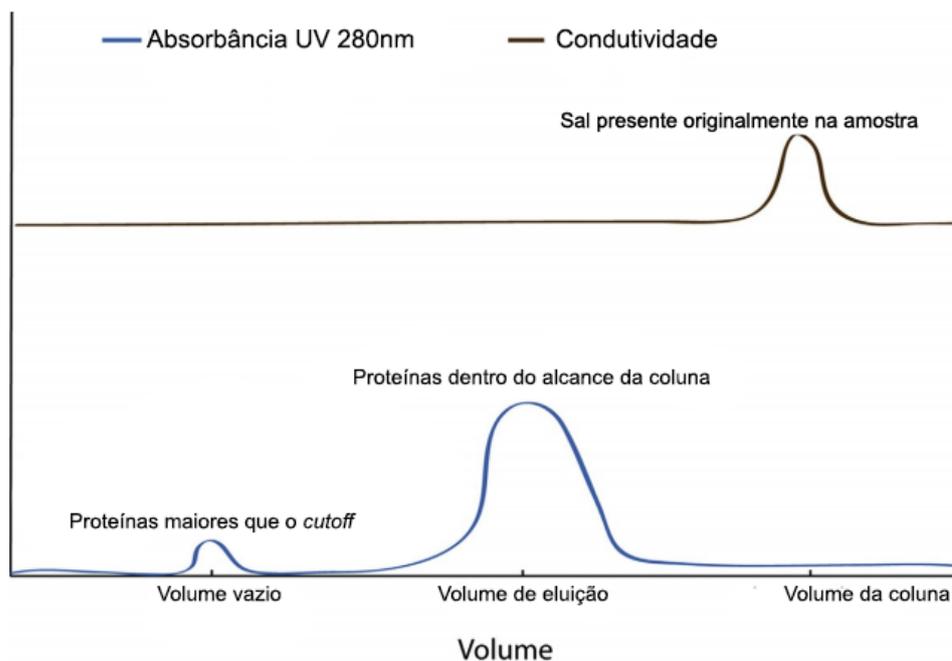
As proteínas foram então misturadas em concentrações equimolares e solubilizadas em tampão desnaturante (Tab. 5), em seguida foram levadas a agitador circular durante 4 horas à temperatura ambiente. Após desnaturação, foram dialisadas em tampão renaturante (Tab. 5) e feitas 4 trocas, a primeira após 6 horas, a segunda *overnight*, a terceira 8 horas, a quarta *overnight*, assim, as amostras foram filtradas para retirar precipitados (Dyer *et al.*, 2004).

**Tabela 5. Tampões utilizados para montagem do dímero.**

<b>Tampão desnaturante</b>	<b>Tampão renaturante</b>
6 M Cloreto de Guanidina	10 mM Tris pH 7,5
20 mM Tris pH 7,5	1 mM EDTA
5 mM DTT	2 M NaCl
	5 mM $\beta$ -mercaptoetanol

### **3.9. Cromatografia por exclusão de tamanho**

A cromatografia por exclusão de tamanho consiste na separação por tamanho da molécula, sendo conhecida também como cromatografia por filtração em gel. A coluna, utilizando Coluna HiTrap Superdex 200 26/600 possui uma matriz de agarose e dextran, formando espaços onde as moléculas se movem, apresentando perfil cromatográfico como demonstrado na figura 6, em que as proteínas maiores que o *cut-off* da coluna são eluídas primeiro, devido a baixa interação com a coluna. As proteínas que estão dentro do tamanho que a coluna consegue separar são eluídas de maneira a sempre as que possuem maior peso molecular serem eluídas primeiro. O tampão utilizado para a cromatografia por exclusão de tamanho é o tampão renaturante descrito na tabela 5.



**Figura 6. Esquema ilustrativo de cromatografia por exclusão de tamanho.** A figura demonstra um perfil cromatográfico básico para cromatografias de exclusão de tamanho, A condutividade nessa análise é alta pela alta quantidade de sal no experimento, no primeiro pico, há a eluição de proteínas maiores que o cut-off da coluna, quando está acontecendo a eluição são eluídas proteínas que estão dentro do alcance da coluna. Já um pico na condutividade devido ao aumento de sal presente na amostra. Adaptado de (Duong-Ly e Gabelli, 2014)

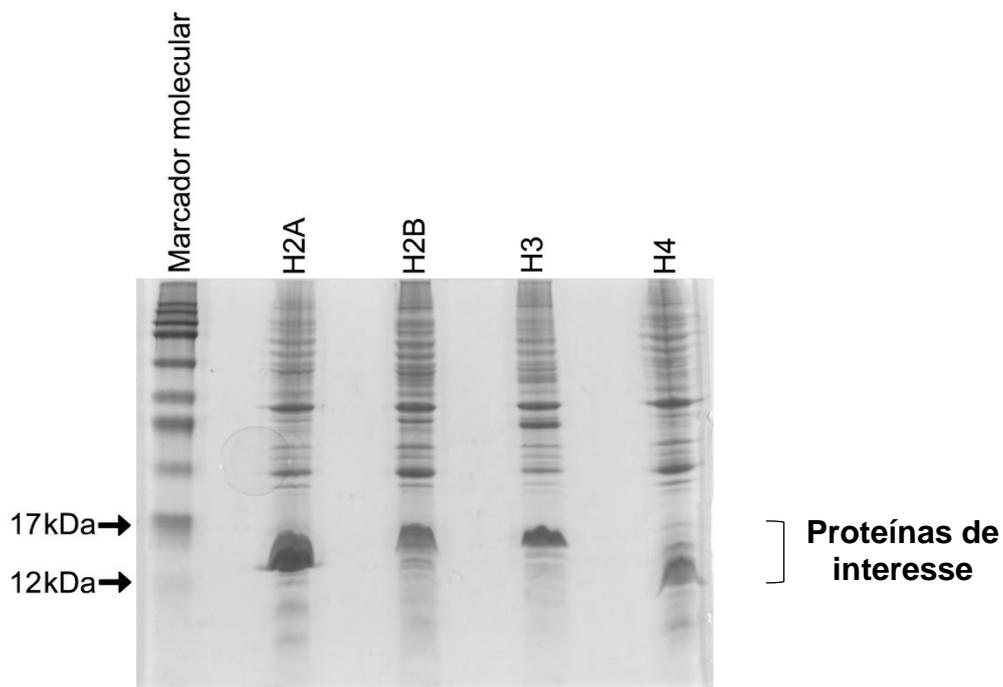
Após diálise e preparação das amostras, estas foram injetadas em equipamento de FPLC ÄKTA™ Pure (GE Healthcare Life Sciences) com a coluna HiLoad Superdex 200 26/600 (GE Healthcare Life Sciences) acoplada, já equilibrada.

Em seguida, as amostras foram recolhidas em frações de 4mL e foi feita eletroforese SDS-PAGE 15% para confirmação das frações. Em seguida à análise do gel, os picos de interesse foram identificados e armazenados em glicerol em -20°C para uso posterior.

## 4. Resultados/ Discussão

### 4.1. Purificação de Histonas

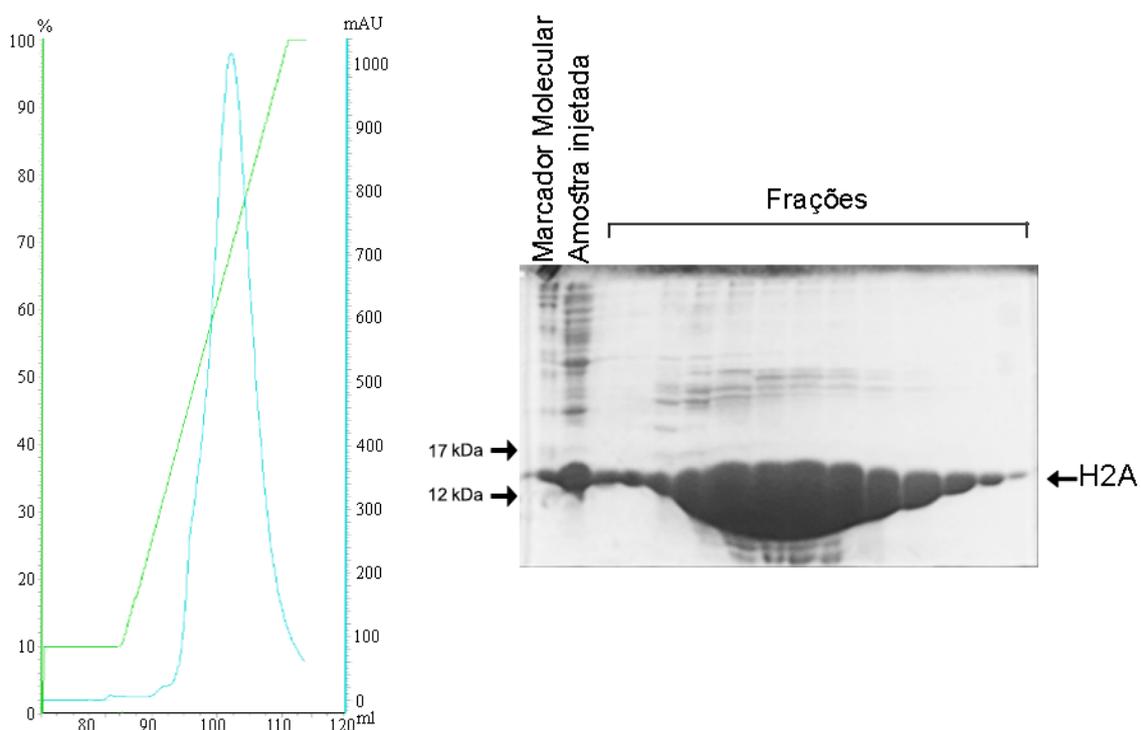
Para obtenção das histonas recombinantes, utilizamos o sistema de expressão de proteínas por indução espontânea, conforme descrito em materiais e métodos. Na figura 7, observamos que todas as quatro histonas, H2A, H2B, H3 e H4 foram bem expressas, o que possibilita seguir para a purificação individual.



**Figura 7. Extrato bacteriano das proteínas recombinantes.** Observamos aqui a expressão das histonas, entre 12 e 17 kDa,. Gel SDS-PAGE 15%.

## 4.2. Purificação H2A

A proteína H2A possui 129 resíduos de aminoácido e peso molecular 13.9 kDa. Conforme observado na figura 8, esta histona apresentou a melhor expressão. Observamos também que a H2A foi a histona com melhores resultados na purificação. A cromatografia de troca iônica foi feita sob as condições descritas na tabela 3, como pode ser visto na figura 8, que mostra um gel SDS PAGE, obteve um grau de purificação satisfatória para montagem do dímero. É importante observar a presença de proteínas contaminantes em baixas concentrações, e também um moderado grau de proteólise. Entretanto, a relação entre H2A e contaminante é baixa, existindo uma fração muito maior da proteína de interesse que de contaminantes.



**Figura 8. Purificação de proteína H2A.** A direita perfil cromatográfico mostrando pico em azul, e em verde a concentração do tampão B. A esquerda gel SDS-PAGE 15% com as frações correspondentes ao pico, mostrando em destaque a proteína H2A.

A proteína H2A foi eluída em 20% do tampão B, gerando um único pico com absorbância UV máxima de 1100 mAU, mostrando grande concentração proteica, o perfil cromatográfico está descrito na tabela 6.

**Tabela 6. Perfil de cromatografia da histona H2A.**

<b>Concentração - % Fase Móvel</b>		
	<b>mL</b>	<b>Concentração Fase Móvel</b>
<b>Equilíbrio</b>		10 %
<b>Injeção da amostra</b>		10 %
<b>Eluição</b>	0 mL	10 %
	10 mL	30 %
	20 mL	60 %
	30 mL	80 %
	40 mL	100 %

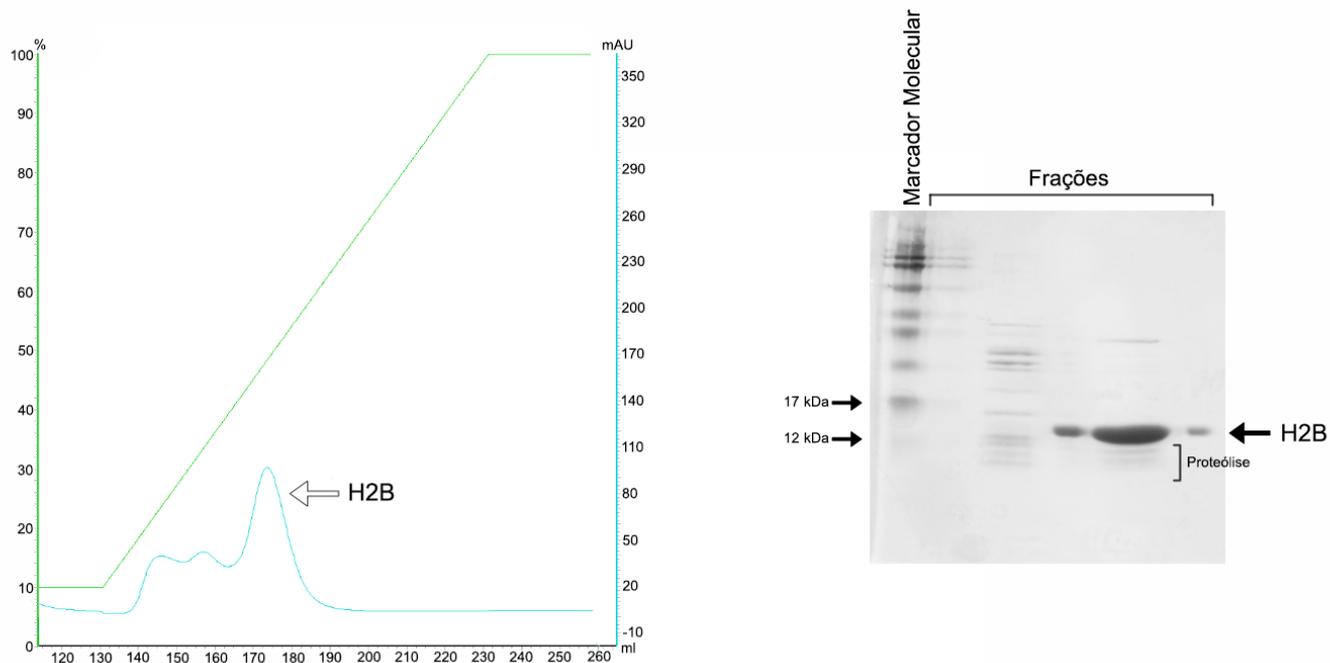
#### **4.3. Purificação H2B**

A histona H2B possui 126 aminoácidos e 13,78 kDa. A histona H2B não teve uma purificação com grande recuperação proteica, como podemos observar na figura 9, onde é possível verificar no gel SDS- PAGE que em relação a histona H2A não obtivemos a mesma quantidade e nem moderado grau de proteólise.

**Tabela 7. Perfil de cromatografia da histona H2B.**

<b>Concentração - % Fase Móvel</b>			
	<b>mL</b>	<b>Concentração</b>	<b>Fase</b>
		<b>Móvel</b>	
<b>Equilíbrio</b>		10 %	
<b>Injeção da amostra</b>		10 %	
<b>Eluição</b>	0 mL	10 %	
	20 mL	30 %	
	60 mL	60 %	
	80 mL	80 %	
	100 mL	100 %	

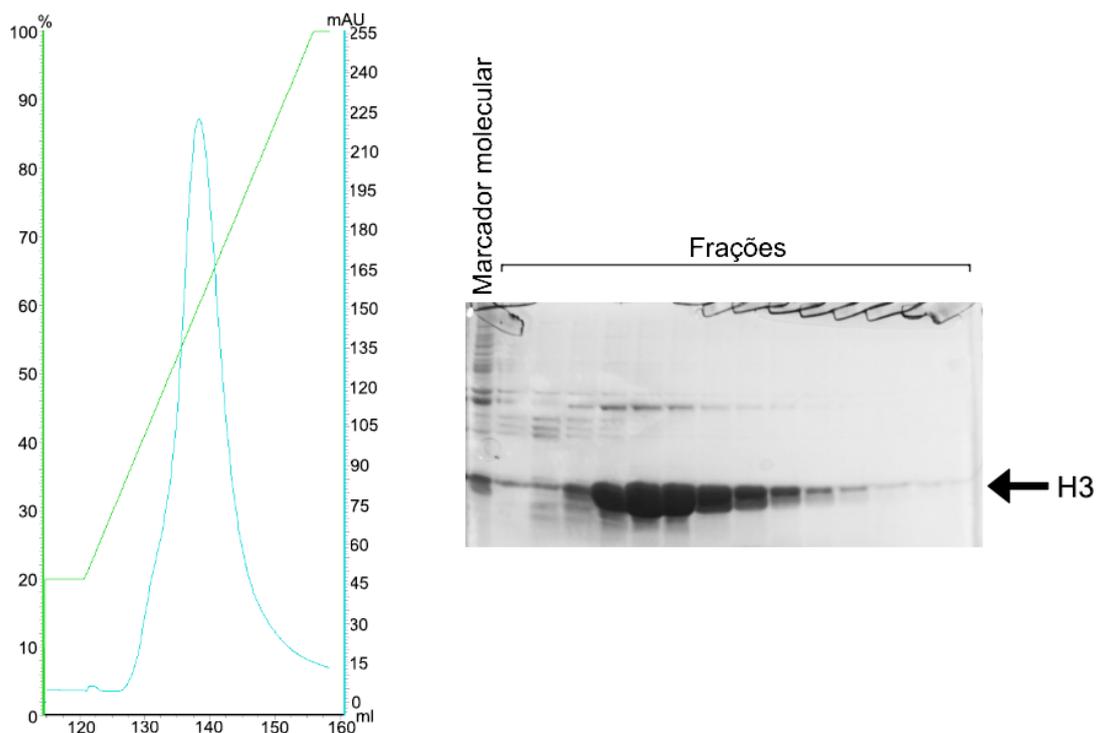
A concentração e pureza de H2B foi suficiente para a reconstituição do dímero. A cromatografia de troca iônica foi feita sob as condições descritas na tabela 7, sendo ela eluída em 40% da fase móvel B, gerando um pico com absorbância máxima de 110 mAU.



**Figura 9. Purificação de proteína H2B.** A direita perfil cromatográfico mostrando pico em azul, e em verde a concentração do tampão B. A esquerda gel SDS-PAGE 15% com as frações correspondentes ao pico, mostrando em destaque a proteína H2B.

#### 4.4. Purificação H3

Possui 135 aminoácidos e peso molecular de 15,27 kDa. Conforme observado na figura 10, no gel SDS PAGE, houve purificação das proteínas H3, com pouca proteólise e pequeno grau de contaminação. A cromatografia de troca iônica foi realizada sob as condições descritas na tabela 8. A proteína foi eluída em 47% da fase móvel B. O pico apresentou absorvância máxima em 225 mAU.



**Figura 10. Purificação de proteína H3.** A direita perfil cromatográfico mostrando pico em azul, e em verde a concentração do tampão B. A esquerda gel SDS-PAGE 15% com as frações correspondente ao pico, mostrando em destaque a proteína H3.

**Tabela 8. Perfil de cromatografia da histona H3.**

Concentração - % Fase Móvel			
	mL	Concentração	Fase
		Móvel	
<b>Equilíbrio</b>		20 %	
<b>Injeção da amostra</b>		20 %	
<b>Eluição</b>	0 mL	20 %	
	10 mL	30 %	
	20 mL	60 %	
	30 mL	80 %	
	40 mL	100 %	

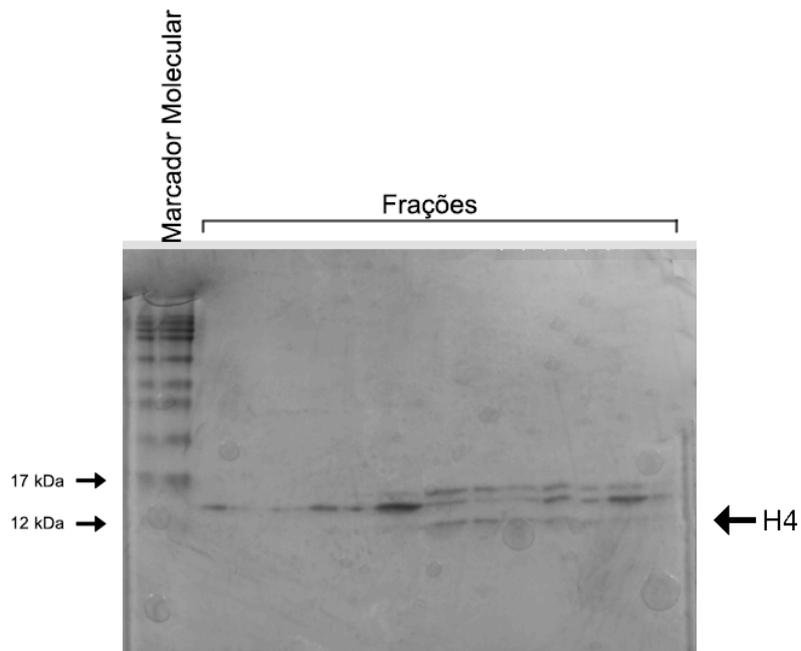
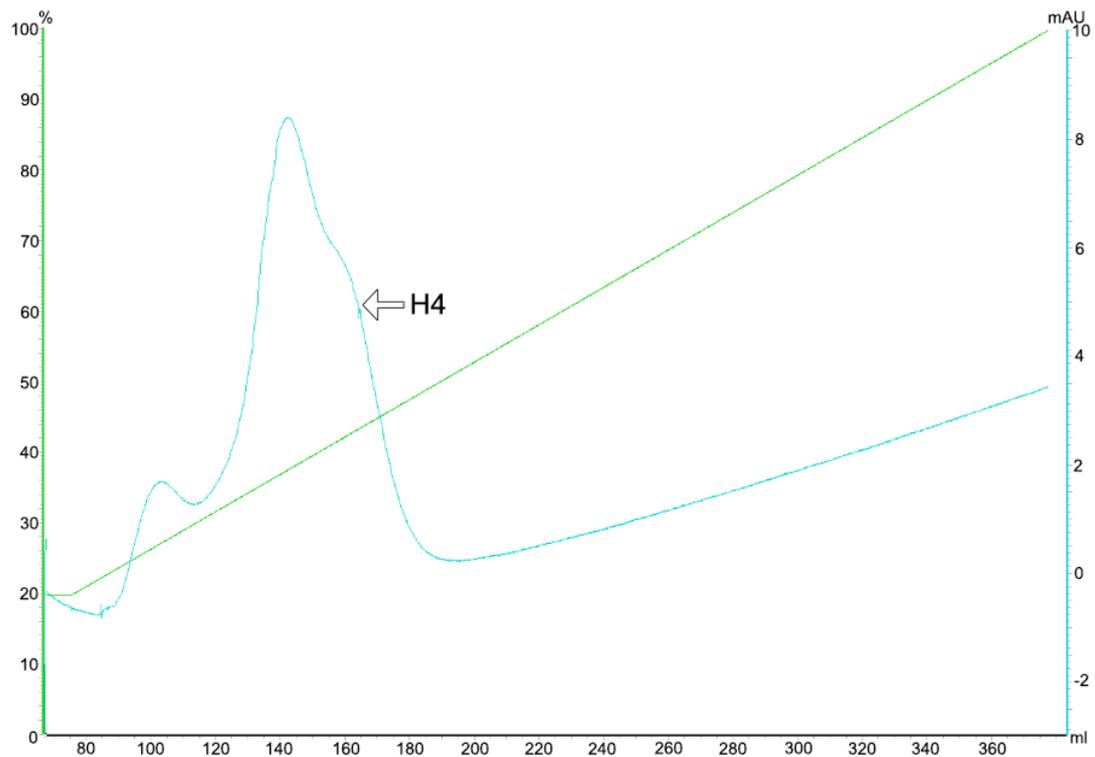
#### 4.5. Purificação H4

A proteína H4 possui Peso molecular de 11,23 kDa e 102 aminoácidos, sendo a histona que obteve a menor recuperação. A proteína foi a única que não foi purificada, sendo eluída em conjunto com contaminantes. Uma proteína de aproximadamente 13 kDa nativa da bactéria foi melhor purificada que ela, ou seja, no gel SDS PAGE da figura 11, é possível notar a aparição dessa proteína nas primeiras frações apresentadas, enquanto a H4 é eluída nas últimas frações recolhidas. Na sua eluição há grandes quantidades de contaminante. Dessa forma, é necessário refazer a expressão e purificação dessa histona, pois, não foi obtida nem boa concentração nem grau de pureza necessário para posteriores estudos.

Tabela 9. Perfil cromatográfico de purificação da proteína H4.

Concentração - % Fase Móvel		
	mL	Concentração Fase Móvel
<b>Equilíbrio</b>		20 %
<b>Injeção da amostra</b>		20 %
<b>Eluição</b>	0 mL	20 %
	40 mL	30 %
	60 mL	60 %
	240 mL	80 %
	300 mL	100 %

A eluição da proteína ocorreu em 45% de tampão B, e teve menor, entre as 4 proteínas purificadas, concentração, como pode-se observar devido a absorbância máxima para fração de H4 de 6 mAU. Os dados usados para a cromatografia iônica se encontram na tabela 9.



**Figura 11. Purificação de proteína H4.** A cima perfil cromatográfico mostrando pico em azul, e em verde a concentração do tampão B. Abaixo gel SDS-PAGE 15% com as frações correspondente ao pico, mostrando em destaque a proteína H4.

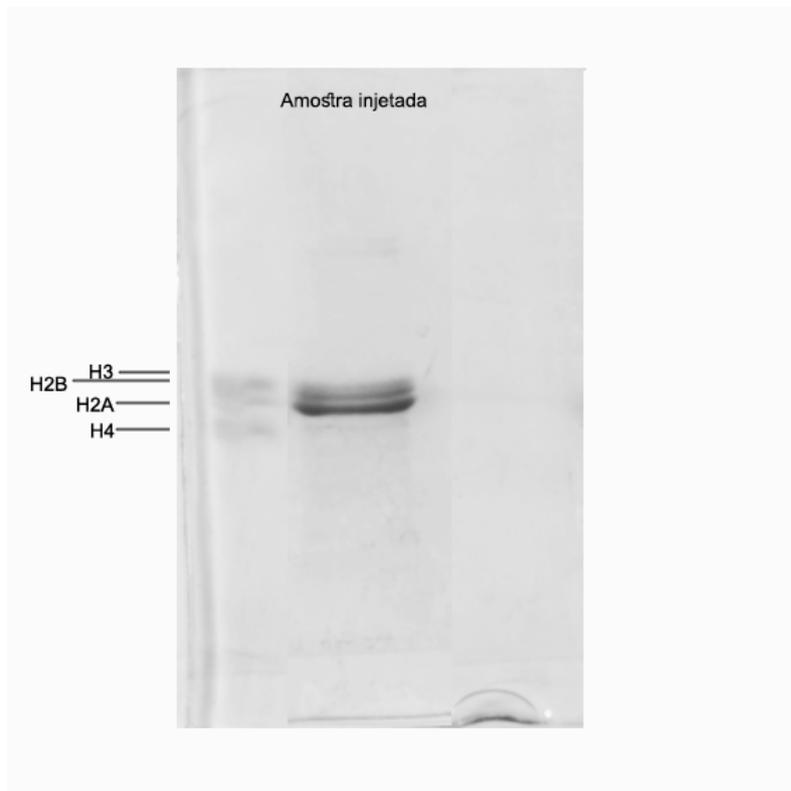
#### **4.6. Reconstituição Dímero H2A:H2B**

As proteínas purificadas foram solubilizadas em tampão desnaturante e dialisadas em tampão com alta concentração de sal, sendo que a retirada do tampão desnaturante já irá promover o redobramento das proteínas. O sal neutraliza as cargas, e isso facilita a interação entre as histonas, visto que ambas possuem carga residual positiva. O dialisado (Fig. 12) é então injetado no FPLC e é esperado que se tenha picos como os descritos em métodos.

Na amostra injetada, observa-se que há uma concentração de H2A muito maior que a concentração de H2B e H3, enquanto a concentração de H4 é ínfima, pois sua purificação não foi bem sucedida.

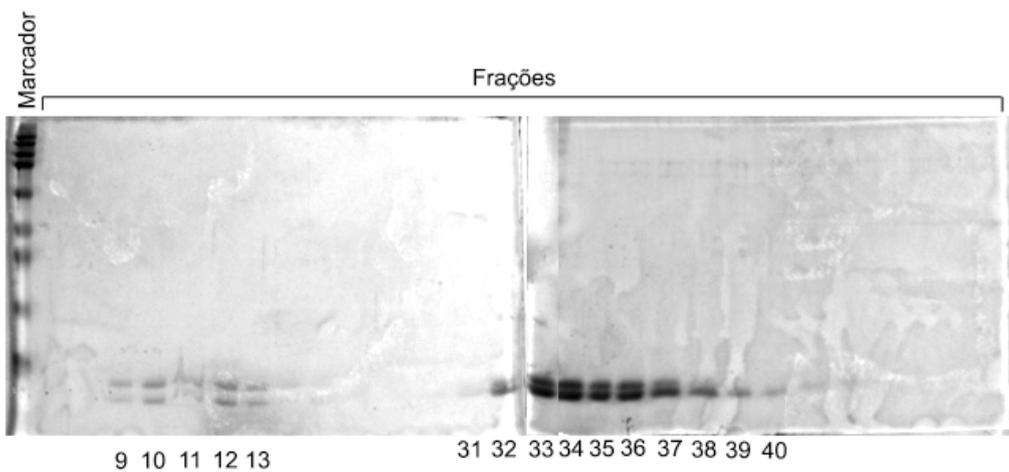
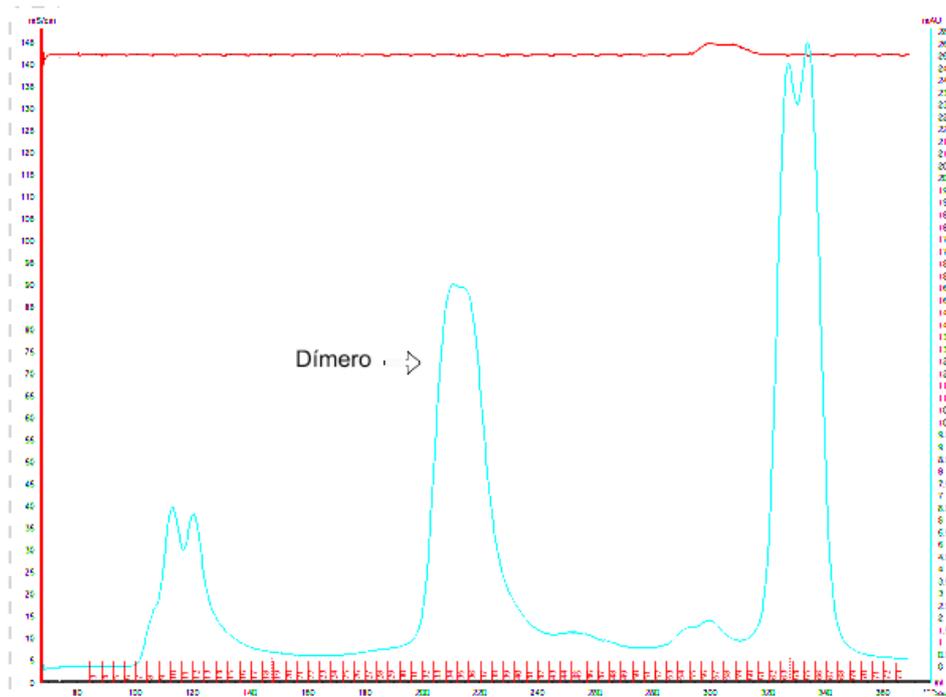
Nas frações correspondentes ao primeiro pico, há um complexo formado por H3 e H2A (Frações 9, 10, 11, 12 e 13), ele é eluído antes pois apresenta maior peso molecular do que o dímero (Fig 13).

No segundo pico, é possível visualizar a formação do dímero. Como a concentração de H2A foi maior que a de H2B, há a formação do dímero (Frações 33, 34, 35, 36) e no final do pico se obtém somente a histona H2A (Frações 39,40) (Fig. 13). O pico referente ao dímero apresentou intensidade máxima de 15.5 mAU.



**Figura 12. Amostra injetada reconstituição dímero.** Como controle, a esquerda no gel está o octâmero proveniente de eritrócitos de galinha. SDS-PAGE 15%.

O último pico não foi ilustrado pois na análise do gel SDS-PAGE não foi visualizada nenhuma banda de interesse, sendo somente contaminantes, e todos eles apresentavam intensidade fraca.

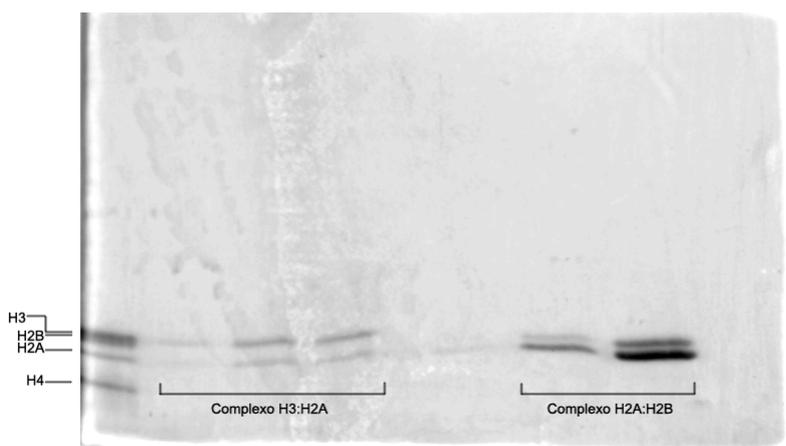


**Figura 13. Cromatografia de exclusão de tamanho.** Acima perfil cromatográfico da separação molecular, as frações de 9 a 13 são referentes ao primeiro pico apresentado, as frações de 31 a 40 são referentes ao segundo pico apresentado, em que se encontra o dímero e os últimos picos não foram representados por não apresentarem bandas de alta intensidade SDS-PAGE 15%.

Afim de verificar se as frações realmente correspondiam as respectivas histonas, é possível observar as frações com o octâmero de histonas proveniente de eritrócitos de galinha utilizado como controle, confirmando que há a formação do dímero (Fig 14)

É possível visualizar um complexo que provavelmente foi formado pelas histonas H3:H2A, já que essas correspondem as bandas do octâmero de histonas utilizado como controle. Esse complexo refere-se ao primeiro pico da cromatografia (Fig 13).

O dímero de histonas possui alta intensidade nas bandas referentes às proteínas H2A e H2B. Ao longo do pico, é possível visualizar que o complexo se forma e depois há uma diminuição da histona H2B sendo eluída somente a proteína H2A (Fig 13). No gel para a confirmação, as frações testadas correspondiam ao início do pico, sendo elas 31 e 32, mostrando a formação do (Fig. 14). As frações 33 e 34 já apresentam bandas com intensidades próximas, sendo essas utilizadas para estudos estruturais (Fig.13)



**Figura 14. Gel SDS PAGE 15% para confirmação dos complexos formados na reconstituição do dímero H2A:H2B** Os complexos H3:H2A estão na altura dos referentes a essas proteínas quando comparados ao octâmero de histonas utilizado para controle, enquanto o dímero está presente na mesma altura das proteínas H2A e H2B.

## 5. Conclusão

O presente estudo faz parte de um grande projeto em que se estuda moléculas ligantes de nucleossomo (*NBM – Nucleosome binding molecules*), como elas interagem e como peptídeos podem interferir na arquitetura da cromatina.

Foi obtido êxito na purificação do dímero de histonas, H2A:H2B para ser utilizado em futuros estudos estruturais da cromatina. Além disso, como perspectivas futuras, o protocolo de na purificação da proteína H4 será otimizado para que possa ser feita para montagem do octâmero de histonas.

**CAPÍTULO 2- AÇÃO DE EXTRATO LIPÍDICO FECAL DE CAMUNDONGOS  
NA VIABILIDADE CELULAR.**

## 1. INTRODUÇÃO ESPECÍFICA

### 1.1. Interação Microbiota-Hospedeiro

Existe uma gama de micróbios patógenos e não patógenos, porém a microbiota mantém uma relação de mutualismo simbiótica com seu hospedeiro (Hosokawa *et al.*, 2006). A disbiose está associada a patologias devido principalmente aos sinais derivados da microbiota agirem como influenciadores da fisiologia do hospedeiro (Woo e Alenghat, 2017).

Um exemplo já bem caracterizado é a diabetes, pois como a microbiota está ligada à regulação metabólica de glicose e lipídios, o que, na a disbiose, pode provocar um aumento da absorção de lipídios em adipócitos e uma menor sensibilização à insulina (Blandino *et al.*, 2016).

Assim, a microbiota exerce função na homeostase corporal. Existe uma modulação imunológica proveniente da microbiota. Em camundongos livres de germes é possível observar que apresentam linfonodos e baço mal formados e imunoglobulinas em baixas concentrações (Macpherson e Harris, 2004)

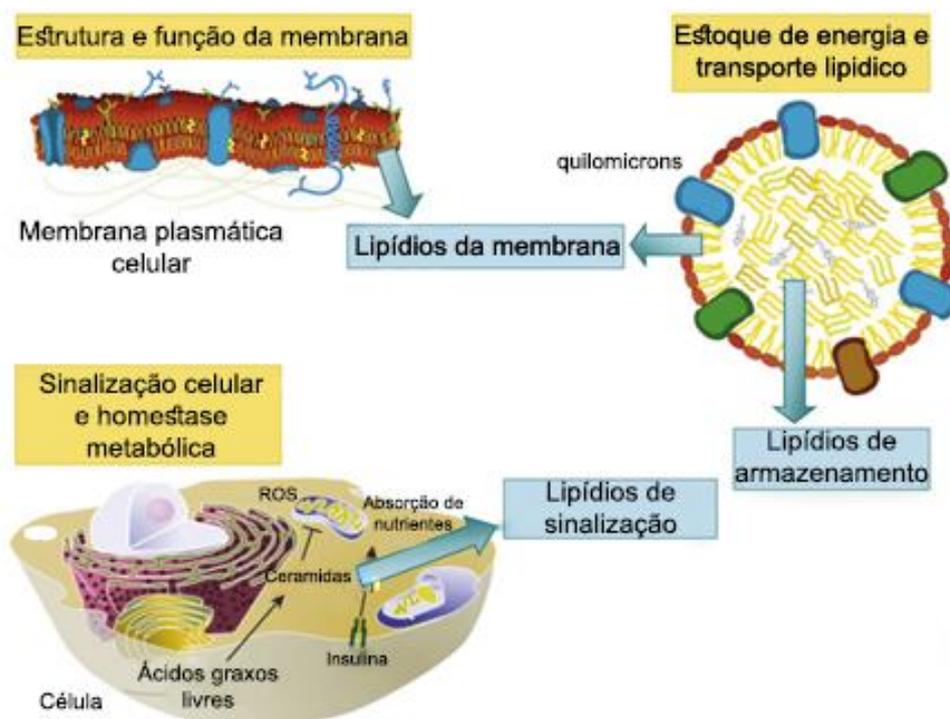
Essa interação entre a microbiota e o sistema imune acontece devido à extensa superfície de contato intestinal e as células imunes presentes nesse ambiente. Todavia, mesmo que importante o contato do hospedeiro com bactérias presentes na microbiota, aumentando respostas imunológicas a patógenos, é importante também manter um equilíbrio para que se tenha o controle do crescimento desses organismos (Sekirov *et al.*, 2010)

Com isso, a microbiota acaba sendo uma barreira física para patógenos, por competição, tanto do espaço ocupado por elas, como pela disputa por nutrientes e produção de substâncias antimicrobianas (Sekirov *et al.*, 2010).

Muitas vias bioquímicas que humanos não possuem, são disponibilizadas pela microbiota, assim, degradação de fibras, proteínas e peptídeos por fermentação para provimento de energia, manutenção da saúde intestinal, são papéis que a microbiota está envolvida, demonstrando o mutualismo desses microrganismos e o hospedeiro (Yadav *et al.*, 2018).

## 1.2. Lipídios

Lipídios são uma classe diversa de pequenas moléculas conhecidas pela sua característica hidrofóbica e podem ser originados de carbânions condensados de tioéster, como os ácidos graxos, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, sacarolipídios e policetidos. Também, os lipídios podem ser originados de carbocátions condensados de isopreno, como por exemplo os lipídios de prenil e lipídios de esteroil (Fahy *et al.*, 2011).



**Figura 15. Papéis biológicos celulares exercidos por lipídios.** Adaptado de Oresic *et al.*, 2008

Além da origem, os lipídeos podem ser também subdivididos de acordo com sua complexidade, já que ao serem hidrolisados os lipídios complexos levam a três ou mais produtos, como os glicoesfingolipídios, enquanto lipídios simples levam a dois produtos, como fosfolipídios (Fahy *et al.*, 2005). É estimado que existam cerca de 200 000 lipídios na natureza (Oresic *et al.*, 2008).

Os lipídeos estão presentes em grandes quantidades do corpo e estão envolvidos em diversos processos metabólicos importantes para fisiologia

celular (Fig. 15). Entretanto, o desbalanço da homeostase lipídica está associado a distintas patologias, como a esteatose hepática, diabetes, doença de Alzheimer, câncer, inflamação, aterosclerose, manifestações tóxicas de doenças infecciosas, esquizofrenia e síndrome metabólica (Oresic *et al.*, 2008).

Lipídios estruturais, em sua maioria, são sintetizados no retículo endoplasmático e após sua síntese, são transportados para a composição de membrana de outras organelas por meio de regulação lipídica, ou por meio de vesículas ou por meio de lipídios de transferência, que são processos regulados pela carga dos lipídios ou por uma espécie secundária de lipídios (Balla *et al.*, 2019).

O Reticulo endoplasmático pode formar organelas conhecidas como gotas de lipídio ou corpos lipídicos, formados por um núcleo neutro de lipídios envolto por uma camada de fosfolipídios, que são conhecidos pelo armazenamento de energia, biossíntese da membrana, sinalização celular, interação com vitaminas hidrofóbicas e proteção celular à lipotoxicidade (Pereira-Dutra *et al.*, 2019).

Quanto à sinalização molecular promovida pelos lipídios, eles podem recrutar proteínas para a membrana celular – fosfatidil inositol fosfatases (PIP), cerídeos e diacilgliceróis, regulação de canais iônicos, ligantes de proteína G (Höglinger *et al.*, 2014).

### **1.3. Metabólitos da microbiota e regulação celular**

A microbiota produz diversos metabólitos que podem interagir com seu hospedeiro, entre eles há a formação de N-acilamidas que são similares a moléculas que se ligam a receptores acoplados a proteína G. Essas moléculas se ligam nos receptores, que podem regular respostas fisiológicas celulares (Cohen *et al.*, 2017).

Existe outro grupo lipídico produzido pela microbiota que pode alterar respostas fisiológicas, os esfingolipídios, que participam de diversas membranas celulares e participam de processos como proliferação, apoptose, diferenciação e migração, sendo que organismos da microbiota são capazes de produzir um

esfingolípido que é um ligante ao receptor CD1d presente em moléculas do sistema imune (Wieland Brown *et al.*, 2013).

Entre os metabólitos que a microbiota produz, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) já foram bem caracterizados. Os AGCC são produtos de reações de fermentação de bactérias anaeróbicas presentes na microbiota, obtido a partir de carboidratos não digeríveis por humanos, os mais bem caracterizados até o momento são acetato, propionato e butirato (Cummings *et al.*, 1987). Existem outros AGCC que são formados pelo catabolismo de aminoácidos (valina, isoleucina e leucina) e se encontram em menor quantidade no organismo, tais como o formiato, valerato, caproato, isobutirato, 2metilbutirato e isovalerato (Macfarlane e Macfarlane, 2007).

Acetato, propionato e butirato estão presentes em grande quantidade no corpo humano e dependem da dieta do hospedeiro (substrato para fermentação) e microbiota (Macfarlane e Macfarlane, 2007).

Os AGCC apresentam funções na manutenção da microbiota, mantendo-a íntegra, evitando inflamação (Lewis *et al.*, 2010) e aumentando a função da barreira intestinal pela regulação de proteínas de junção (Peng *et al.*, 2009) e afetando a produção de muco intestinal (Barcelo *et al.*, 2000)

Os AGCC podem regular a função de diversas proteínas, como por exemplo a histona deacetilase (HDAC) e receptores acoplados à proteína G, atravessam a barreira encefálica e participam de processos diversos no corpo (Dalile *et al.*, 2019).

Dessa forma, a utilização de lipídios provenientes da microbiota podem modular processos fisiológicos. No presente trabalho, serão utilizados extratos lipídicos de material fecal de camundongos expostos a diferentes dietas para observar os efeitos desses extratos na viabilidade celular.

## **2. Objetivo**

### **2.1. Objetivo geral**

Análise da ação de extrato lipídico oriundo de material fecal de camundongos, alimentados com dieta normolipídica e hiperlipídica, sobre a fisiologia celular.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Extração lipídica de material fecal de camundongos sob dieta normolipídica e hiperlipídica;
- Como controle, extração lipídica de ração normolipídica e hiperlipídica;
- Análise da viabilidade de células tumorais e não tumorais, através do método MTT, em presença de extratos lipídicos.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Reagentes

Para a realização desse trabalho foram utilizados os reagentes expostos na tabela 11.

**Tabela 10. Lista de Reagentes utilizados**

<b>Reagente</b>	<b>Fabricante</b>
Cloreto de Sódio	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
Clorofórmio	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Metanol	Vetec Química Fina Ltda, BRA
DMSO	Sigma Aldrich Co., EUA
Isopropanol	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
DMEM	Sigma Aldrich Co., EUA
Tripsina	Sigma Aldrich Co., EUA
MTT	Life Technologies

#### 3.2. Equipamentos

Para a realização desse trabalho foram utilizados os equipamentos expostos na tabela 12.

**Tabela 11. Lista de equipamentos utilizados**

<b>Equipamentos</b>	<b>Fabricantes</b>
Balança semi-analítica	Sartorius, ALE
Banho-maria	Braun Biotech International, ALE
Espectrofotômetro UV-Vis	Shimadzu do Brasil, BRA
PHmetro	Kasvi, BRA
Centrífuga 5702	Eppendorf, BRA
DTX 800 Multimolder Detector	Beckman Coulter, EUA

### 3.3. Extração lipídica

As fezes foram cedidas de outro projeto de pesquisa desenvolvido pelo Laboratório de Farmacologia Molecular pela Professora Doutora Angélica Amato. Estas foram recolhidas de camundongos machos C57BL/6 com 10 semanas de vida, sendo administradas durante 1,5 semanas dietas normolipídica e hiperlipídica, ambas foram fornecidas *ad libitum*, suas composições estão registradas na tabela 13.

A extração lipídica foi feita solubilizando as moléculas hidrofílicas em solução salina e extraíndo moléculas hidrofóbicas com solução de metanol e clorofórmio (Kraus *et al.*, 2015). Como representado na figura 16, as fezes ou ração foram maceradas, solubilizadas em solução salina 0,9% e foi adicionado à solução de clorofórmio-metanol. Após homogeneização e centrifugação, a parte inferior, contendo a fração lipídica, foi retirada e a mistura de metanol clorofórmio foi evaporada a temperatura ambiente. O material seco foi pesado e solubilizado em DMSO.

**Tabela 12. Composição ração hiperlipídica e normolipídica.** Valores referentes a dieta. Fonte: PRAGSOLUÇÕES Biociências®

Ingrediente	Normolipídica	Hiperlipídica
	%kcal	%kcal
Amido de milho	39,8%	11,9%
Caseína	20,0%	15,0%
Amido Dextrinizado	13,2%	7,5%
Sacarose	10,0%	7,5%
Óleo de Soja	15,8%	6,7%
Mix de vitaminas AIN	1%	0,7%
L-cistina	0,3%	0,2%
Banha	0%	50,5%

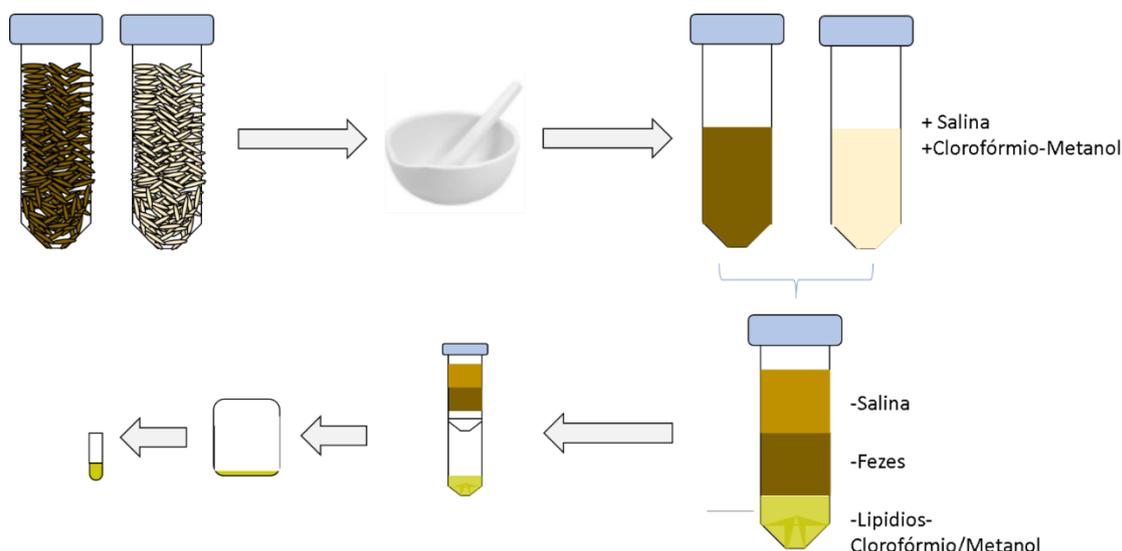


Figura 16. Processo de extração lipídica por metanol: clorofórmio.

### 3.4. Cultivo celular

Para análise dos efeitos dos extratos lipídicos em células foram utilizadas três linhagens distintas: HeLa, HepG2 e células tronco mesenquimais. Todas as linhagens foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Medium + F12 high glucose adicionando 10% de soro fetal bovino, suplementadas com 1% de antibiótico/antimicótico. As células foram cultivadas em frascos de 50 mL, mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

### 3.5. MTT

Todos os ensaios presentes nesse trabalho seguiram o mesmo desenho experimental e foram compostos por triplicatas. As células foram plaqueadas nas densidades de  $3 \times 10^3$  para MSC,  $8 \times 10^3$  para HeLa e HepG2 em placas de 96 poços. Após 24 horas, as células eram tratadas com extratos em suas respectivas concentrações, mantendo em todas elas a mesma quantidade de DMSO. Após 24 horas de tratamento a viabilidade celular era analisada.

A viabilidade celular foi quantificada pelo método de MTT (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium;) que avalia a atividade mitocondrial, formando cristais de coloração roxa – formazan, e cuja intensidade reflete o grau de viabilidade das células (Vistica et al., 1991). Para isto, após cada tratamento

experimental, o meio de cultivo foi substituído pela solução de MTT (10  $\mu$ L da solução de 5mg/ml de MTT diluído em 90 $\mu$ L de DMEM para cada poço). As células foram incubadas durante 4 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente este meio foi retirado, adicionando-se 100 $\mu$ L de isopropanol ácido, composto de isopropanol e ácido clorídrico 0,4%, para a solubilização dos cristais. A viabilidade celular foi medida com auxílio de espectrofotômetro, DTX 800 *Multimolder Detector*, na absorvância medida a 570nm de comprimento de onda.

A análise estatística foi feita pelo programa *Graphpad Prism*. Foram feitos teste de normalidade de *D'Agostino & Pearson normality test* mostrando que os dados seguiam uma distribuição Gaussiana e foi aplicado o teste estatístico *ANOVA two-way* para todas as análises obtidas.

## **4. Resultados/ Discussão**

### **4.1. Extração lipídica e padronização dos extratos**

Através do método metanol/clorofórmio, obtivemos uma solução lipídica, claramente distinta da porção hidrofílica. Após evaporação da solução de metanol/clorofórmio, o extrato lipídico, foi pesado e solubilizado em DMSO, com a concentração final de 94mg/ml.

Para a padronização dos extratos, foi feito um acompanhamento pela mensuração de absorvância no equipamento UV-vis. Na figura 17, estão expressos os comprimentos de onda visualizados nas varreduras realizadas. As mensurações foram feitas na faixa de 200 nm a 300 nm, realizando uma varredura dos picos dos extratos. Na figura 17 é possível observar somente a faixa de 221 nm a 240 nm, pois o objetivo principal era avaliar o grau de oxidação das amostras, já que há a formação de dienos conjugados, que são detectados na faixa de 234 nm (Vieira e Regitano-D'Arce, 1998)

Mesmo que a absorvância no comprimento de 234 nm tenha sido próxima a 0 para todos os extratos, não é possível afirmar que não houve oxidação, já que os extratos são formados por uma mistura de lipídios, que até o momento não foi caracterizado. Porém, esta análise espectrofotométrica me permitiu padronizar os extratos, pois o perfil de absorvância foram muito similares. (Fig. 17)

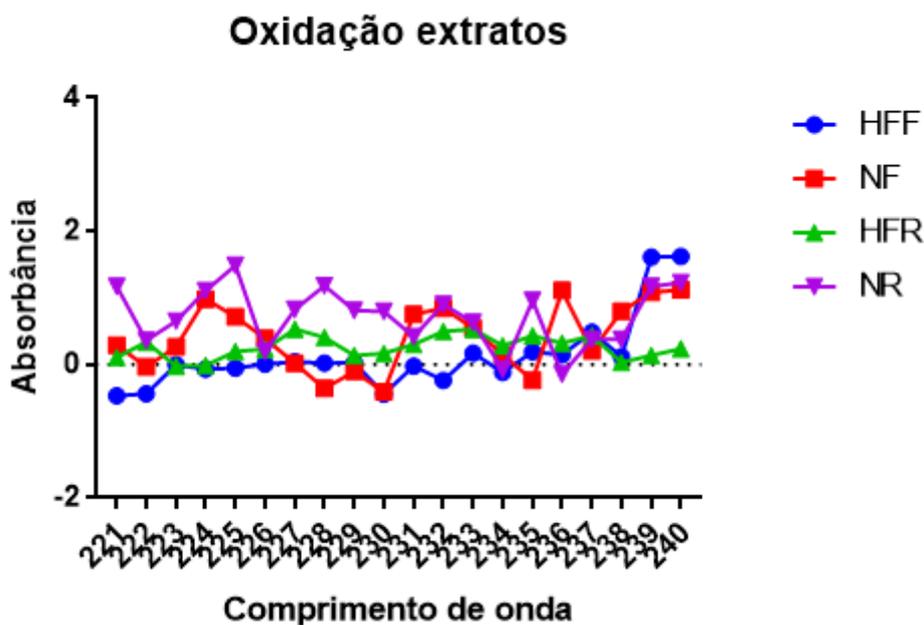


Figura 17. Mensurações espectrofotométricas das regiões de oxidação dos extratos para a padronização.

## 4.2. Viabilidade celular

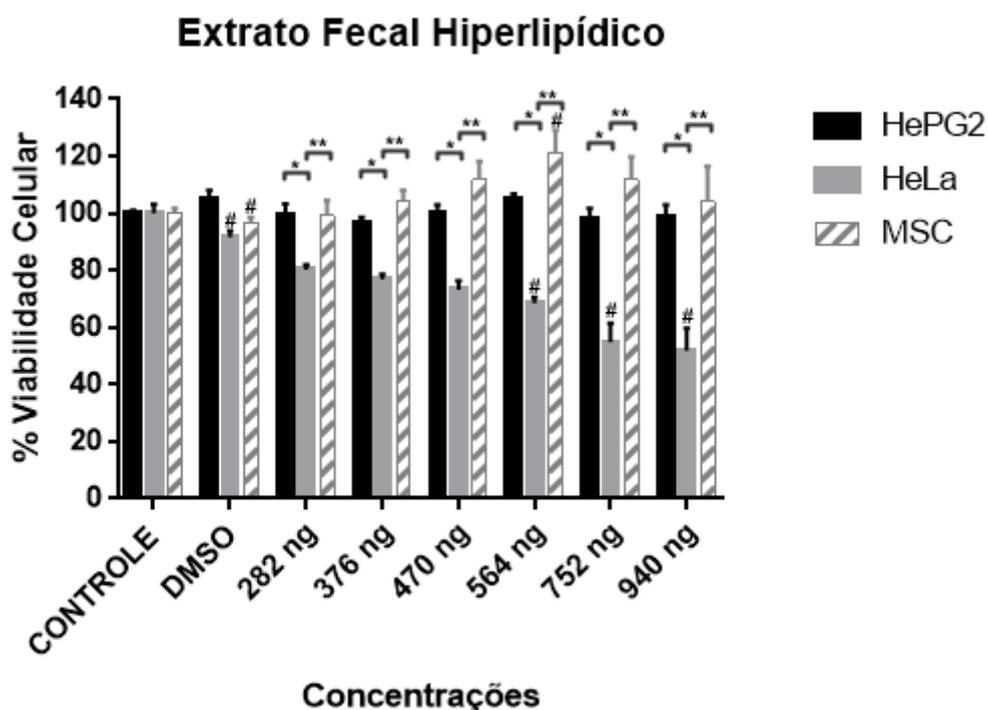
### 4.2.1. Comparação entre linhagens celulares.

A fim de analisar possíveis alterações fisiológicas, no presente estudo foram utilizadas três linhagens celulares, HeLa, uma célula epitelial de um tumor cervical. HepG2, hepatócito proveniente de hepatocarcinoma e MSC (*Mesenchymal Stem Cells*) Células mesenquimais humanas retiradas de tecido adiposo gentilmente cedidas pelo professor Felipe Saldanha, Universidade de Brasília.

#### 4.2.1.1. Extrato Fecal hiperlipídico

O extrato fecal hiperlipídico apresentou um efeito significativo na diminuição da viabilidade de células HeLa, a partir da concentração mais baixa testada (Fig.18)

Em todas as concentrações, a célula HeLa diferiu significativamente das outras linhagens, apresentando uma diminuição da viabilidade celular mais expressiva.



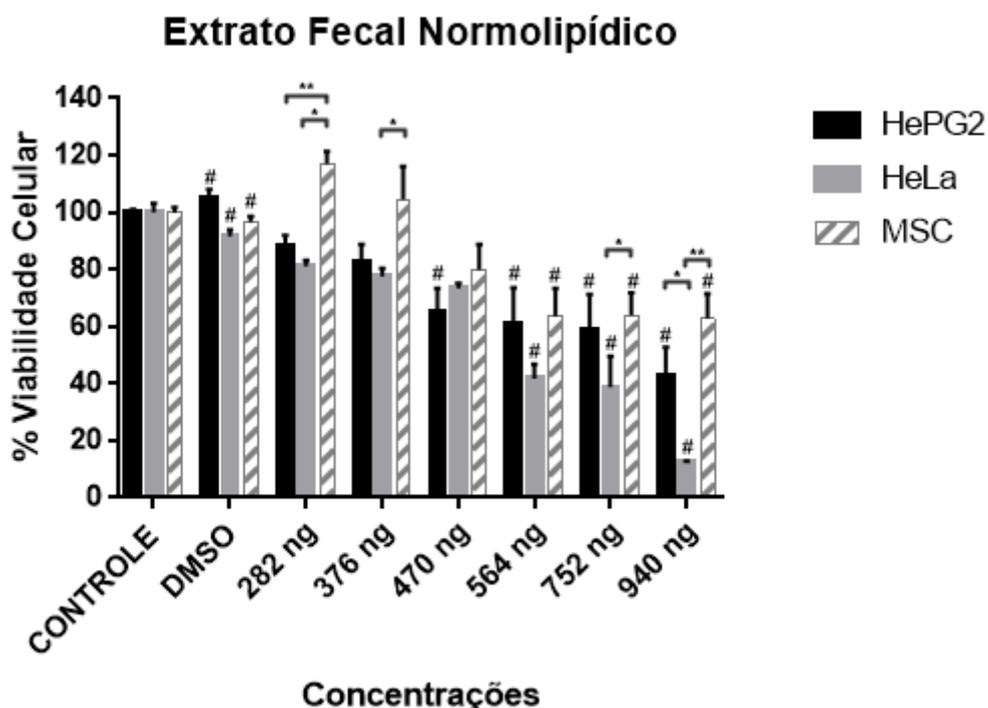
**Figura 18. Efeito do extrato hiperlipídico sobre viabilidade de diferentes linhagens celulares.** Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) no software PrismGraph.

A linhagem HepG2 mantém-se estável quando em presença do extrato hiperlipídico fecal, não apresentando diferença significativa em relação ao controle. Já a célula Mesenquimal quando tratada com Extrato hiperlipídico fecal apresentou uma tendência de aumento da sua viabilidade, sendo possível notar uma diferença significativa em relação ao controle na concentração de 564 ng/ $\mu$ L apresentando aumento de 21,30% na viabilidade celular ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.2. Extrato fecal normolipídico

O extrato fecal normolipídico foi o que obteve menor diferença entre as células, pois todas as linhagens tiveram uma diminuição significativa de sua viabilidade celular nas concentrações de 564, 752 e 940 ng/ $\mu$ L.

Novamente, o maior efeito foi observado na linhagem HeLa que na concentração de 940 ng/μL apresenta viabilidade celular de 12,49%, enquanto as linhagens HepG2 e MSC apresentaram 42,61% e 62,92%, respectivamente.



**Figura 19. Efeito do extrato normolipídico sobre viabilidade de diferentes linhagens celulares.** Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) no software PrismGraph

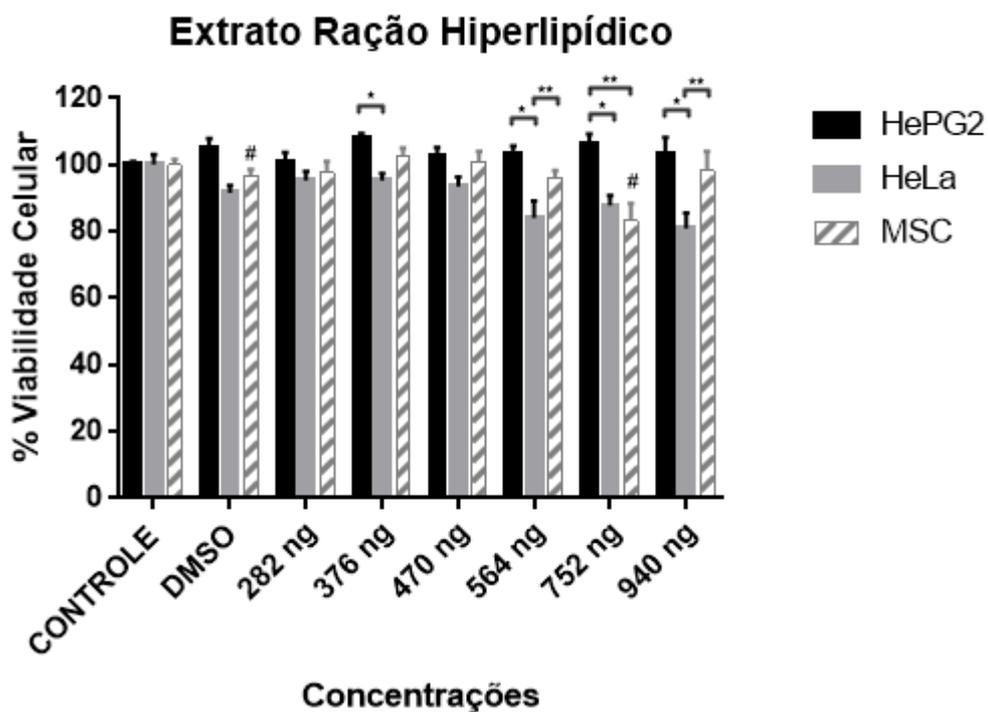
O extrato derivado da dieta hiperlipídica apresentou uma menor variação entre as linhagens celulares (Fig. 20), já o normal apresentou um aumento da viabilidade das linhagens MSC e HepG2 (Fig. 21). Como esperado, esta diferença em resposta do normolipídico para o hiperlipídico sugere que exista diferença na composição lipídica dos extratos.

#### 4.2.1.3. Extrato ração hiperlipídico

Para os extratos provenientes da ração hiperlipídica, novamente a linhagem celular HeLa apresentou diferença significativa em relação as outras

duas linhagens nas concentrações 564 ng/μL e 940 ng/μL, enquanto a célula HepG2 apresentou diferença significativa na concentração 752 ng/μL.

Nesse caso, exclusivamente a linhagem MSC apresentou diferença significativa em relação ao controle e apenas na concentração de 752 ng/μL, obtendo viabilidade celular de 83,11% ( $p < 0,05$ ).



**Figura 20. Efeito do extrato hiperlipídico proveniente de ração sobre viabilidade de diferentes linhagens celulares.** Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ) no software PrismGraph

#### 4.2.1.4. Extrato razão normolipídico

O extrato normolipídico novamente causou morte celular nas células HeLa, enquanto aumentou a viabilidade celular nas células HepG2 e MSC. Observa-se que houve diferença significativa nas concentrações 470 ng/μL e 564 ng/μL entre a HeLa e as outras linhagens ( $p < 0.05$ ).

As células HepG2 apresentaram diferença significativa em relação as outras duas linhagens nas concentrações de 752 ng/μL e 940 ng/μL, porém nesse caso a viabilidade celular aumentou em relação ao controle.

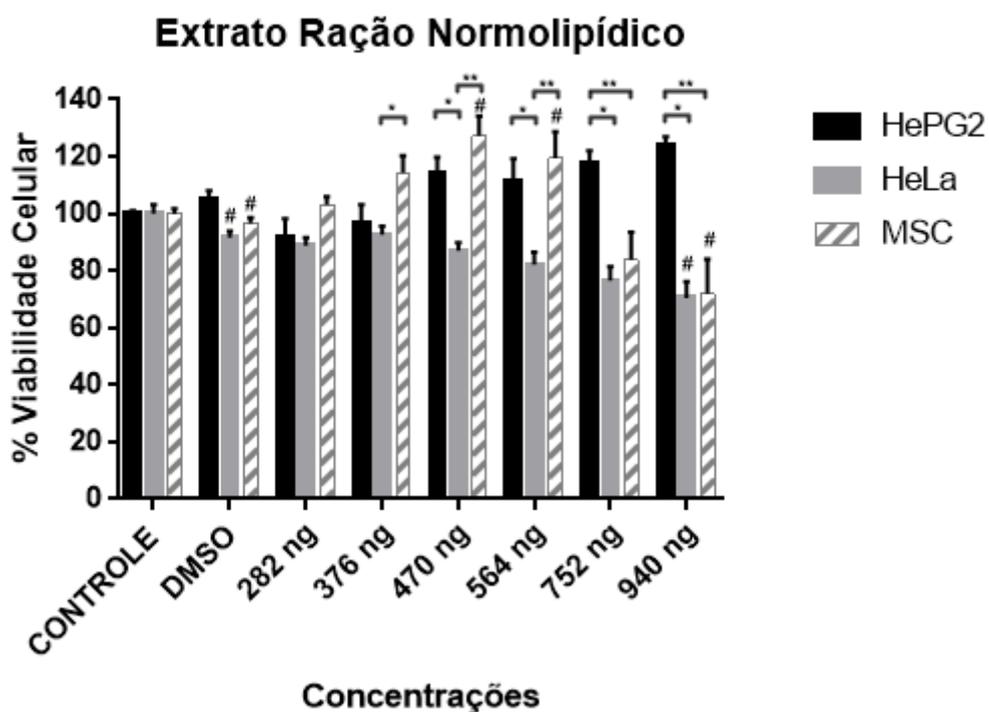


Figura 21. Efeito do extrato normolipídico proveniente de ração sobre viabilidade de diferentes linhagens celulares. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) no software PrismGraph

#### 4.2.2. Comparação entre extratos

Após comparação entre linhagens celulares, será feita agora a comparação entre extratos dentro de cada grupo celular. Dessa forma, é possível observar quais alterações na viabilidade celular os extratos apresentam em cada célula.

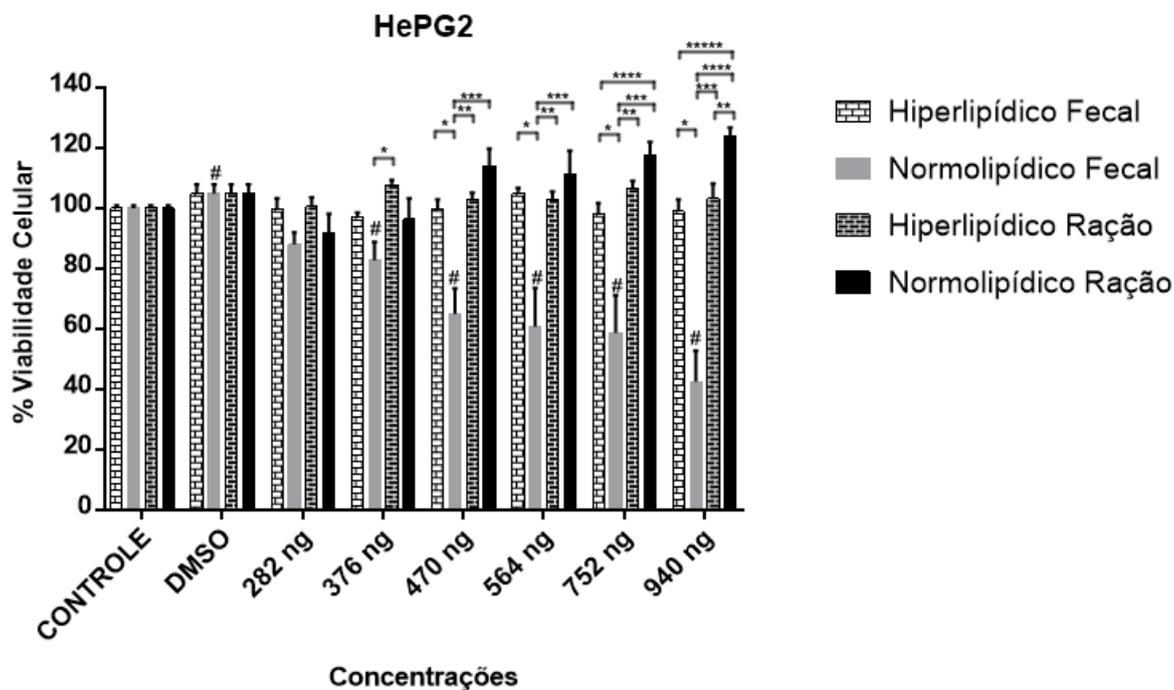
#### 4.2.2.3. HepG2

Na linhagem HepG2, observa-se que houve diferenças significativas entre os extratos hiperlipídico e normal, proveniente de material fecal nas concentrações de 470 ng/ $\mu$ L , 564 ng/ $\mu$ L , 752 ng/ $\mu$ L e 940 ng/ $\mu$ L . Não apresentando diferenças entre o extrato hiperlipídico de material fecal e de ração.

Contudo, analisando os compostos normolipídicos, houve diferença significativa entre o material fecal e a ração em todas as concentrações, exceto na de 282 ng. Sendo esse o único composto a obter diferença significativa em relação ao controle e novamente somente na concentração de 282 ng não houve diferença.

A linhagem HepG2, por ser uma célula hepática, pode acumular esses lipídios provenientes de ração e de material fecal hiperlipídico, sendo que as concentrações utilizadas não foram lipotóxicas para a célula, enquanto o extrato normolipídico fecal pode ter ocasionado a morte celular por lipotoxicidade. Já é demonstrado na literatura que há lipotoxicidade e acúmulo lipídico em células HepG2 (Yao *et al.*, 2011)

Para o extrato fecal normolipídico, é possível que existam AGCC, já que o propionato pode exercer diminuição da proliferação celular, por inibir HDAC em tumores hepáticos (Bindels *et al.*, 2012).



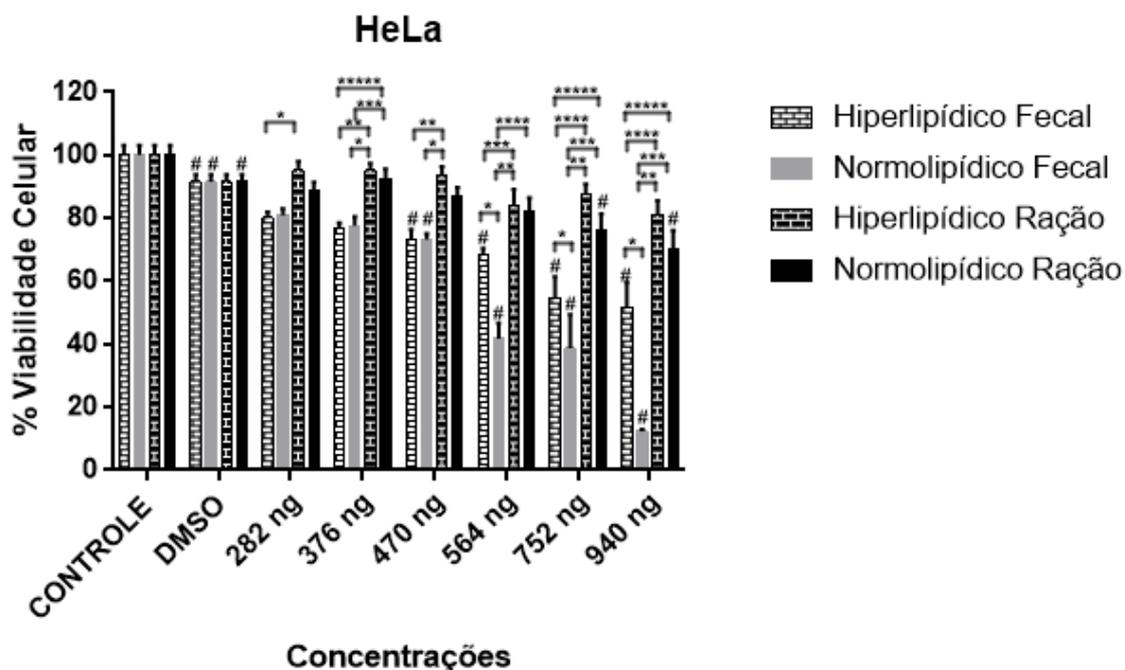
**Figura 22 Efeitos da aplicação de extratos sobre a célula HepG2.** Diferenças significativas entre extratos estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) no software PrismGraph

#### 4.2.2.4. HeLa

A linhagem HeLa foi a que apresentou maior variação entre os grupos, além de apresentar maiores diferenças em relação ao controle, apresentando diferença entre todas as concentrações.

Os extratos fecais obtiveram diferença nas concentrações de 564 ng/ $\mu$ L , 752 ng/ $\mu$ L e 940 ng/ $\mu$ L ( $p < 0,05$ ). Em contrapartida, nas concentrações 282 ng/ $\mu$ L , 376 ng/ $\mu$ L , e 470 ng/ $\mu$ L dos extratos, as células obtiveram viabilidades muito próximas.

Os extratos fecais tiveram diferença em relação ao seu respectivo extrato da ração nas concentrações de 564 ng/ $\mu$ L , 752 ng/ $\mu$ L e 940 ng/ $\mu$ L . Somente o extrato hiperlipídico proveniente de ração não apresentou diferença em relação ao controle.



**Figura 23. Efeitos da aplicação de extratos sobre a célula HeLa.** Diferenças significativas entre extratos estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) no software PrismGraph

Talvez a diminuição da viabilidade celular de HeLa possa ser efeito de estresse oxidativo gerado pelo extrato. Já é descrito na literatura que a HeLa consegue formar gotas de lipídio (Lipid droplet- LD) e essa estrutura pode ser responsável por ser uma fonte de energia em processos cancerígenos, aumentando sua viabilidade celular.

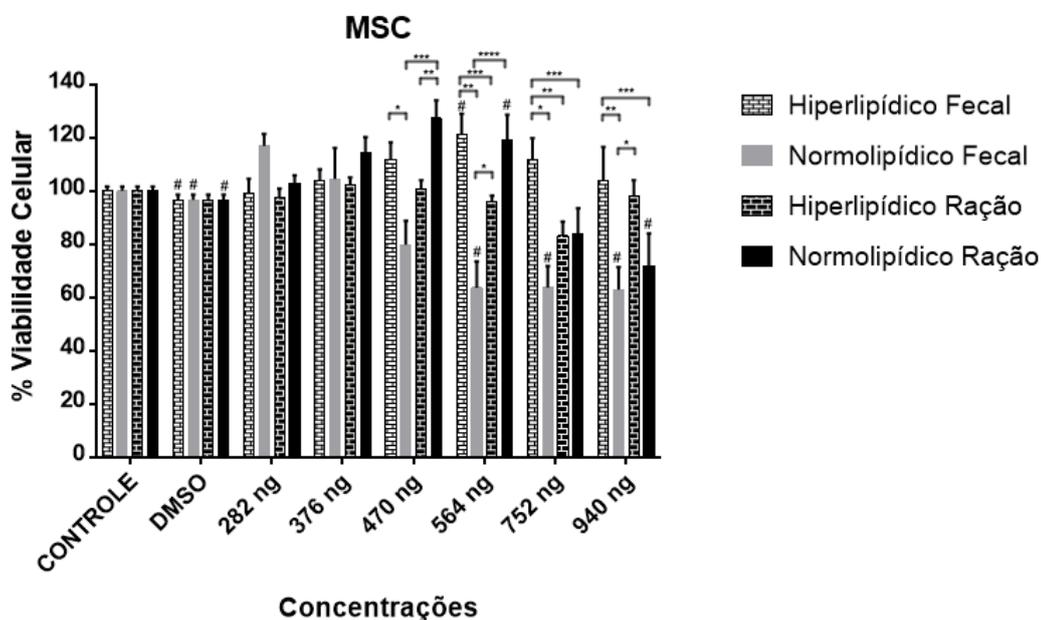
Por outro lado, também já foi visto em estudos que essas gotas de lipídio também podem levar ao estresse oxidativo, o que pode resultar em morte celular, em células HeLa em meio pobre em nutrientes (Guštin *et al.*, 2017).

Talvez, os extratos lipídicos fecais possuam certos compostos que facilitem essa morte celular por estresse oxidativo, ou possuam compostos que atuem de maneira anti oncogênica (Bindels *et al.*, 2012).

#### 4.2.2.5. MSC

As células mesenquimais apresentaram um padrão diferenciado das outras duas linhagens estudadas, com uma ampliação da viabilidade celular seguido por diminuição em relação ao aumento da concentração, nos extratos hiperlipídico fecal e normolipídico ração, apresentando diferença significativa em relação ao controle na concentração de 564 ng/μL de 121,44% e 119,36%, respectivamente.

Entre os extratos fecais, houve diferença nas concentrações 470 ng/μL , 564 ng/μL , 752 ng/μL e 940 ng/μL . Já entre os extratos hiperlipídicos fecal e ração, houve diferença entre 564 ng/μL e 752 ng/μL . Entre os normolipídicos a diferença ocorreu nas concentrações 470 ng/μL e 564 ng/μL ( $p < 0,05$ ).



**Figura 24. Efeitos da aplicação de extratos sobre a célula MSC.** Diferenças significativas entre extratos estão representadas por asteriscos enquanto o jogo da velha representa a diferença significativa entre respectivos controles e extratos. Análises feitas por two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ) no software PrismGraph

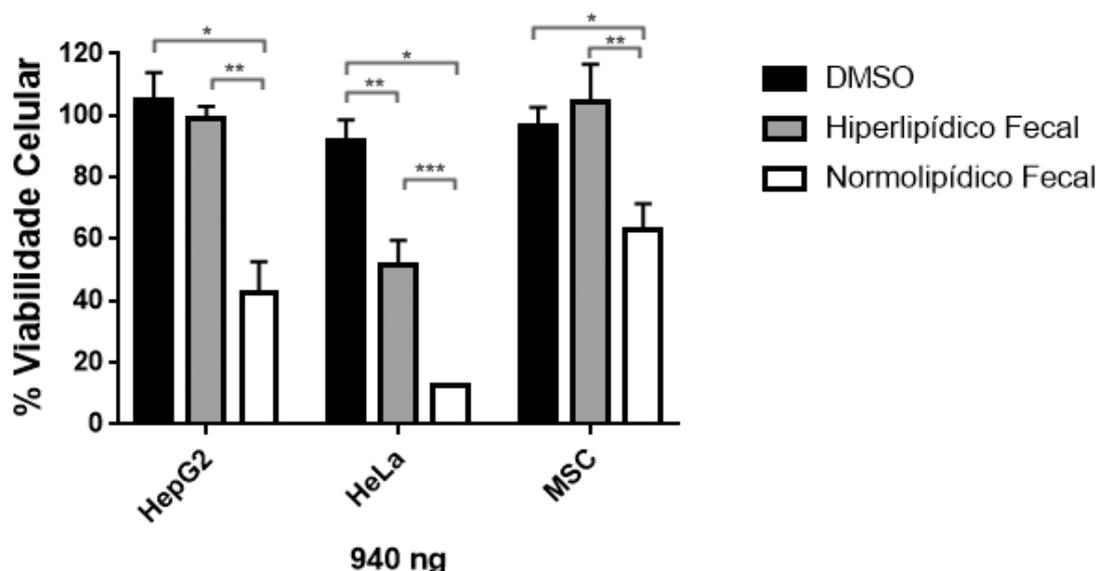
As células MSC, além de não serem tumorais, podem ter respondido aos extratos lipídicos com alta taxa de aumento na viabilidade celular em relação ao controle por sua capacidade de diferenciação. (Han *et al.*, 2017).

Diversas evidencias suportam a ideia de que o transplante fecal possa ser utilizado no tratamento de uma grande variedade de doenças, como por exemplo contaminação por *clostridium* e doenças metabólicas (Liubakka e Vaughn, 2016). Entretanto, a utilização de bactérias vivas dificulta a utilização deste material. Com isto, estes estudos preliminares dos extratos lipídicos fecais abrem caminho para o a utilização potencial desta classe de moléculas presentes na microbiota, evitando-se a utilização de organismos vivos.

## 5. Conclusão

Primeiramente, o presente estudo mostrou que há diferenças entre o componente lipídico da na ração e o encontrado no seu material fecal de camundongos. Este achado é muito importante por mostrar que provavelmente exista a formação de metabolitos lipídicos no material fecal com significativas ações sobre a fisiologia celular.

Na figura 25, apresento um resumo dos principais achados da ação dos extratos fecais, normolipídico e hiperlipídico, sobre a viabilidade das 3 linhagens celulares testadas. Observamos aqui, que o extrato normolipídico fecal induziu fortemente a diminuição da viabilidade das três células, com ênfase para a HeLa e HepG2. Além disto, fica claro notar a forte ação do extrato hiperlipídico fecal sobre a célula HeLa, diferentemente da HePG2 e MSC. Importante enfatizar que o extrato normolipídico fecal e extrato hiperlipídico fecal apresentaram efeitos discretos sobre a viabilidade da célula não tumoral, MSC, quando comparadas as linhagens tumorais.



**Figura 25. Efeitos da aplicação de extratos fecais em todas as linhagens na maior concentração.** Diferenças significativas entre extratos estão representadas por asteriscos. Análises feitas por two-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) no software PrismGraph

Além disto, , foi possível identificar que diferentes células apresentam respostas distintas aos extratos testados, sendo marcante a diferença entre as

células não tumorais e tumorais Também, a diferença entre os grupos de extratos hiperlipídicos e normolipídicos levanta a hipótese de que a microbiota de camundongos sob dieta normolipídica pode apresentar um maior impacto sobre a modulação da fisiologia celular.

Finalmente, acredito que precisamos de mais estudos para podermos utilizar somente os extratos lipídicos fecais para gerar novas formas de produção de suplementos ou até medicamentos.

## 5. Referencias

ANDERSON, J. D.; WIDOM, J. Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites<sup>11</sup> Edited by T. Richmond. *Journal of Molecular Biology*, v. 296, n. 4, p. 979-987, 2000/03/03/ 2000. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600935319> >.

BALLA, T.; SENGUPTA, N.; KIM, Y. J. Lipid synthesis and transport are coupled to regulate membrane lipid dynamics in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019/05/18/ 2019. ISSN 1388-1981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198119300757> >.

BARCELO, A. et al. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut*, v. 46, n. 2, p. 218-224, 2000. ISSN 0017-5749 1458-3288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10644316> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1727811/> >.

BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, v. 535, n. 7610, p. 85-93, 2016. ISSN 1476-4687 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27383983> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5114849/> >.

BINDELS, L. B. et al. Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. *British Journal Of Cancer*, v. 107, p. 1337, 09/13/online 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.409> >.

BLANDINO, G. et al. Impact of gut microbiota on diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolism*, v. 42, n. 5, p. 303-315, 2016/11/01/ 2016. ISSN 1262-3636. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1262363616303962> >.

CANI, P. D. et al. Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nature Metabolism*, v. 1, n. 1, p. 34-46, 2019. ISSN 2522-5812.

CHUNG, C. T.; MILLER, R. H. Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells, *Methods in Enzymology*, v. 218, p. 621-627, 2013. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799318045E1> >

COHEN, L. J. et al. Commensal bacteria make GPCR ligands that mimic human signalling molecules. *Nature*, v. 549, n. 7670, p. 48-53, 2017. ISSN 0028-0836 1476-4687.

CUMMINGS, J. H. et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, v. 28, n. 10, p. 1221, 1987. Disponível em: < <http://gut.bmj.com/content/28/10/1221.abstract> >.

CUTTER, A. R.; HAYES, J. J. A brief review of nucleosome structure. *FEBS letters*, v. 589, n. 20 Pt A, p. 2914-2922, 2015. ISSN 1873-3468 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25980611> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4598263/> >.

DALILE, B. et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2019/05/23 2019. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3> >.

DEN BESTEN, G. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, v. 54, n. 9, p. 2325-2340, 2013. ISSN 1539-7262  
0022-2275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23821742>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3735932/> >.

DILLON, N. Heterochromatin structure and function. *Biol Cell*, v. 96, n. 8, p. 631-7, Oct 2004. ISSN 0248-4900 (Print)  
0248-4900.

DORIGO, B. et al. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, v. 306, n. 5701, p. 1571-3, Nov 26 2004. ISSN 0036-8075.

DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. *Methods Enzymol*, v. 541, p. 105-14, 2014. ISSN 0076-6879.

DYER, P. N. et al. Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. *Methods Enzymol*, v. 375, p. 23-44, 2004. ISSN 0076-6879 (Print)  
0076-6879.

FAHY, E. et al. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta*, v. 1811, n. 11, p. 637-47, Nov 2011. ISSN 0006-3002 (Print)  
0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704189> >.

FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*, v. 46, n. 5, p. 839-61, May 2005. ISSN 0022-2275 (Print)  
0022-2275 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15722563> >.

FAZARY, A. E.; JU, Y.-H.; ABD-RABBOH, H. S. M. How does chromatin package DNA within nucleus and regulate gene expression? *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 101, p. 862-881, 2017/08/01/ 2017. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017304786> >.

GAGNIÈRE, J. et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, v. 22, n. 2, p. 501-518, 2016. ISSN 2219-2840  
1007-9327. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26811603>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4716055/> >.

GENSOLLEN, T. et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science (New York, N.Y.)*, v. 352, n. 6285, p. 539-544, 2016. ISSN 1095-9203  
0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27126036>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5050524/> >.

GORDON, F.; LUGER, K.; HANSEN, J. C. The core histone N-terminal tail domains function independently and additively during salt-dependent oligomerization of nucleosomal arrays. *J Biol Chem*, v. 280, n. 40, p. 33701-6, Oct 7 2005. ISSN 0021-9258 (Print)  
0021-9258.

GREWAL, S. I. S.; JIA, S. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics*, v. 8, p. 35, 01/01/online 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nrg2008> >.

GUŠTIN, E. et al. Lipid Droplet Formation in HeLa Cervical Cancer Cells Depends on Cell Density and the Concentration of Exogenous Unsaturated Fatty Acids. 2017. 549-554.

HAN, I. et al. Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells Is Related to Their Intrinsic Mechanical Properties. *International neurology journal*, v. 21, n. Suppl 1, p. S24-S31, 2017. ISSN 2093-4777 2093-6931. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28446012> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5426435/> >.

HÖGLINGER, D.; NADLER, A.; SCHULTZ, C. Caged lipids as tools for investigating cellular signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1841, n. 8, p. 1085-1096, 2014/08/01/ 2014. ISSN 1388-1981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198114000651> >.

HOSOKAWA, T. et al. Strict Host-Symbiont Cospeciation and Reductive Genome Evolution in Insect Gut Bacteria. *PLOS Biology*, v. 4, n. 10, p. e337, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040337> >.

HU, Y. et al. Large-scale chromatin structure of inducible genes: transcription on a condensed, linear template. *The Journal of Cell Biology*, v. 185, n. 1, p. 87-100, 2009. Disponível em: < <http://jcb.rupress.org/content/jcb/185/1/87.full.pdf> >.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005> >. Acesso em: 2019/06/15.

KRAUS, D.; YANG, Q.; KAHN, B. B. Lipid Extraction from Mouse Feces. *Bio-protocol*, v. 5, n. 1, p. e1375, 2015. ISSN 2331-8325. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27110587> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4838042/> >.

LAWRENCE, M.; DAUJAT, S.; SCHNEIDER, R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet*, v. 32, n. 1, p. 42-56, Jan 2016. ISSN 0168-9525 (Print) 0168-9525.

LEWIS, K. et al. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm Bowel Dis*, v. 16, n. 7, p. 1138-48, Jul 2010. ISSN 1078-0998.

LEY, R. E. et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, v. 320, n. 5883, p. 1647-51, Jun 20 2008. ISSN 0036-8075.

LIUBAKKA, A.; VAUGHN, B. P. Clostridium difficile Infection and Fecal Microbiota Transplant. *AACN advanced critical care*, v. 27, n. 3, p. 324-337, 2016. ISSN 1559-7776 1559-7768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27959316> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666691/> >.

LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, v. 389, n. 6648, p. 251-60, Sep 18 1997. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

LUGER, K. et al. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. Edited by A. Klug. *Journal of Molecular Biology*, v. 272, n. 3, p. 301-311, 1997/09/26/ 1997. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283697912353> >.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 62, n. 1, p. 67-72, 2007. ISSN 0029-6651. Disponível em: < <https://www.cambridge.org/core/article/regulation-of-shortchain-fatty-acid-production/9F72ACBE8EE4BE71616589CEE6A777D7> >.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*, v. 4, n. 6, p. 478-85, Jun 2004. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733.

MARABELLI, C. et al. A Tail-Based Mechanism Drives Nucleosome Demethylation by the LSD2/NPAC Multimeric Complex. *Cell Rep*, v. 27, n. 2, p. 387-399.e7, Apr 9 2019.

MARSTON, F. A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal*, v. 240, n. 1, p. 1-12, 1986. ISSN 0264-6021 1470-8728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3548705> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1147368/> >.

MATTIROLI, F. et al. Structure of histone-based chromatin in Archaea. *Science*, v. 357, n. 6351, p. 609-612, 2017. Disponível em: < <https://science.sciencemag.org/content/sci/357/6351/609.full.pdf> >.

MOYA, A.; FERRER, M. Functional Redundancy-Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance. *Trends in Microbiology*, v. 24, n. 5, p. 402-413, 2016. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.002> >. Acesso em: 2019/06/15.

NATIVIDAD, J. M. M.; VERDU, E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacological Research*, v. 69, n. 1, p. 42-51, 2013/03/01/ 2013. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661812001946> >.

O'HARA, A. M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, v. 7, n. 7, p. 688-693, 2006. ISSN 1469-221X 1469-3178. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16819463> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1500832/> >.

ORESIC, M.; HANNINEN, V. A.; VIDAL-PUIG, A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers. *Trends Biotechnol*, v. 26, n. 12, p. 647-52, Dec 2008. ISSN 0167-7799 (Print) 0167-7799 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951641> >.

OU, H. D. et al. ChromEAT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science*, v. 357, n. 6349, p. eaag0025, 2017. Disponível em: < <https://science.sciencemag.org/content/sci/357/6349/eaag0025.full.pdf> >.

PENG, L. et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr*, v. 139, n. 9, p. 1619-25, Sep 2009. ISSN 0022-3166.

PEREIRA-DUTRA, F. S. et al. Fat, fight, and beyond: The multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 0, n. 0, 2019/05/23 2019. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0119-035R> >. Acesso em: 2019/06/06.

SAMBROCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p. 442-453, 2004. ISSN 1415-4757. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572004000300022&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572004000300022&nrm=iso) >.

SEKIROV, I. et al. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010/07/01 2010. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009> >. Acesso em: 2019/06/15.

SPERLING, A. S.; GRUNSTEIN, M. Histone H3 N-terminus regulates higher order structure of yeast heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 32, p. 13153-13159, 2009. ISSN 1091-6490 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666585> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2726386/> >.

TANAKA, Y. et al. Expression and purification of recombinant human histones. *Methods*, v. 33, n. 1, p. 3-11, 2004/05/01/ 2004. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202303002883> >.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 72, n. 2, p. 211, 2006/06/22 2006. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8> >.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical journal*, v. 474, n. 11, p. 1823-1836, 2017. ISSN 1470-8728 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28512250> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5433529/> >.

TROJER, P.; REINBERG, D. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell*, v. 28, n. 1, p. 1-13, Oct 12 2007. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765.

VENKATESH, S.; WORKMAN, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 16, n. 3, p. 178-189, 2015a. ISSN 1471-0072 1471-0080.

\_\_\_\_\_. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 16, p. 178, 02/04/online 2015b. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nrm3941> >.

VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. STABILITY OF OILS HEATED BY MICROWAVE: UV - SPECTROPHOTOMETRIC EVALUATION. *Food Science and Technology*, v. 18, p. 433-437, 1998. ISSN 0101-2061. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20611998000400015&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000400015&nrm=iso) >.

WIELAND BROWN, L. C. et al. Production of  $\alpha$ -Galactosylceramide by a Prominent Member of the Human Gut Microbiota. *PLOS Biology*, v. 11, n. 7, p. e1001610, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001610> >.

WOO, V.; ALENGHAT, T. Host-microbiota interactions: epigenomic regulation. *Current opinion in immunology*, v. 44, p. 52-60, 2017. ISSN 1879-0372 0952-7915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28103497> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5451311/> >.

YADAV, M.; VERMA, M. K.; CHAUHAN, N. S. A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. *Archives of Microbiology*, v. 200, n. 2, p. 203-217, 2018/03/01 2018. ISSN 1432-072X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1459-x> >.

YAO, H.-R. et al. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. *American journal of translational research*, v. 3, n. 3, p. 284-291, 2011. ISSN 1943-8141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21654881> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3102573/> >.

ZHOU, B.-R. et al. Atomic resolution cryo-EM structure of a native-like CENP-A nucleosome aided by an antibody fragment. *Nature communications*, v. 10, n. 1, p. 2301-2301, 2019. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31127102> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6534667/> >.

ZHU, P.; LI, G. Structural insights of nucleosome and the 30-nm chromatin fiber. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 36, p. 106-115, 2016/02/01/ 2016. ISSN 0959-440X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X16000166> >.