

# RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA ALFA-7 ( $\alpha 7nAChR$ ) NA PREVENÇÃO DE DANOS ASSOCIADOS AO ESTRESSE DE RETÍCULO NO CONTEXTO INFLAMATÓRIO

Palavras-Chave: ESTRESSE DE RETÍCULO, RECEPTOR COLINÉRGICO, CÉLULA NEURONAL

Autores(as):

POLIANA MILAN BORDON (aluna), FCA – UNICAMP

Prof. Dr. MARCIO ALBERTO TORSONI (orientador), FCA - UNICAMP

Dr. NILTON SANTOS (co-orientador), FCA - UNICAMP

---

## INTRODUÇÃO:

O elevado consumo de dietas hiperlipídicas (HFD) tem sido associado a alterações metabólicas e inflamação crônica de baixo grau. O estado pró-inflamatório crônico pode comprometer funções metabólicas, entre elas a capacidade do retículo endoplasmático de dobrar adequadamente e modificar pós traducionalmente proteínas secretoras e transmembranares, levando a um acúmulo de proteínas mal dobradas na organela, condição que caracteriza o estresse do retículo endoplasmático e ativa a resposta de proteínas mal dobradas (do inglês, *unfolded protein response* - UPR).

A sinalização da UPR induz um conjunto de eventos transcricionais e translacionais visando restaurar a homeostase do RE e as funções celulares normais. Regiões sensíveis a alterações, como é o caso do hipotálamo, região importante no controle do balanço energético através de conexões neuroendócrinas responsivas à ação de hormônios, podem ser acometidas pelo estado desregulatório. O receptor nicotínico de acetilcolina alfa-7 ( $\alpha 7nAChR$ ), amplamente presente no hipotálamo, quando ativado por acetilcolina (ACh) ou um ligante farmacológico, pode atuar como um canal de cálcio, possibilitando a liberação de neurotransmissores, ou então ativar a via JAK2-STAT3 e reduzir a expressão de citocinas inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6.

Desse modo, o objetivo da pesquisa foi investigar o estresse de retículo endoplasmático através de marcadores presentes na via da UPR por meio da avaliação da expressão gênica por RT-qPCR de *Atf6*, *Atf4* e *Eif* e do conteúdo protéico por western blotting de ATF6, p-IRE, p-EIF, EIF, XBP1 e p-PERK. Isso foi realizado em células neuronais mHypoA-2/29 WT e KO para *Chrna7* tratadas com meio contendo soro de camundongos expostos à dieta controle (DC) ou dieta hiperlipídica (HFD 45%). Para isso, o soro coletado de camundongos C57BL/6 expostos à DC ou HFD por 4 semanas foi utilizado para o tratamento de células mHypoA-2/29 WT e KO para *Chrna7*.

## METODOLOGIA:

Camundongos C57BL/6 *Mus musculus* machos wild-type (WT) com 6 semanas de idade foram divididos em dois grupos (cada com n=10) e expostos à dieta controle (9% da composição proveniente de gordura) ou hiperlipídica (45% da composição proveniente de gordura) durante 4 semanas. Após esse período, os animais foram anestesiados, eutanasiados e o sangue coletado para obtenção do soro que foi armazenado a -80 °C até o tratamento com as células.

As células mHypoA-2/29 (WT) e mHypoA-2/29 knockout (KO) para o gene *Chrna7*, que codifica o receptor  $\alpha 7nAChR$ , foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) com alta concentração de glicose (4500 mg/L) suplementado com bicarbonato de sódio (3,7 g/L), 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina

(100 U/mL)/estreptomicina (100 µg/mL), mantidas em estufa incubadora a 37°C de temperatura, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, plaqueadas em placas de 6 wells e incubadas por 24h ou 48h com meio de cultura DMEM suplementado com 2% do soro dos grupos de camundongos.

Após o tempo de incubação foram coletadas as proteínas e o RNA das células para realização de western blot e Real Time q-PCR. Através do western blot foram analisadas a expressão de proteínas para ATF6, p-IRE, p-EIF, EIF, XBP1 e p-PERK e através do Real Time q-PCR foram analisadas a expressão gênica de *Atf6*, *Atf4* e *Eif*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Embora tenha sido possível investigar a presença da vinculina (controle interno do experimento), não tivemos sucesso na avaliação da expressão das proteínas alvo por western blot (Fig.1).

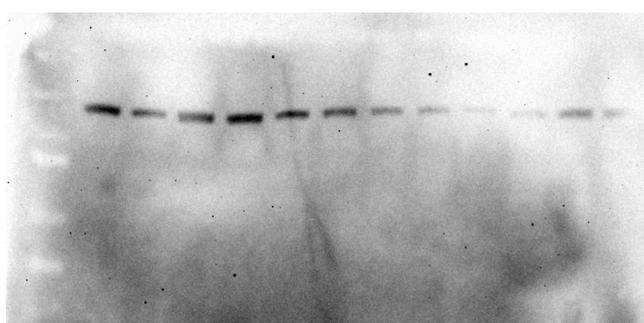
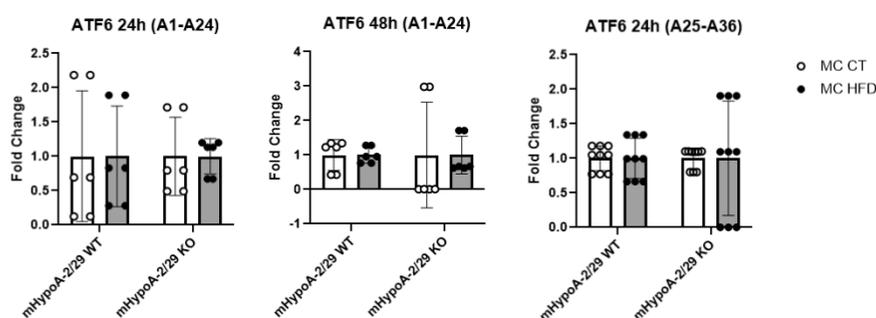


Figura 1: Expressão proteica de vinculina

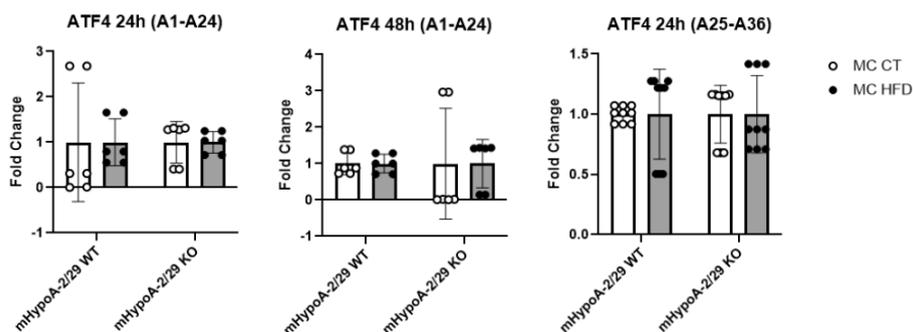
Durante as análises da expressão gênica por Real Time q-PCR encontramos problemas com os primeiros primers endógenos testados (GAPDH e ACTB), o que fez com que fosse necessário substituí-los pelo endógeno RPL7, o qual apresentou resultados coerentes. Com os valores do novo endógeno em mãos foi possível compará-lo estatisticamente com os valores obtidos na análise das amostras para os genes alvo.

As células mHypoA-2/29 WT e mHypoA-2/29 KO da primeira coleta (amostras 1 a 24: A1-A24) foram tratadas com os soros dos animais por 24 e 48 horas e na segunda coleta (amostras 25 a 36: A25-A36) apenas por 24h. Não houve alteração na expressão gênica de *Atf6* nas células mHypoA-2/29 KO e WT tratadas com meio condicionado (MC) pelo soro de animais alimentados com dieta HFD (MC HFD) após 24h (Fig. 2A) e 48h (Fig. 2B) na primeira coleta e após 24h (Fig. 2C) na segunda coleta quando comparadas com as células tratadas com meio condicionado (MC) pelo soro de animais alimentados com dieta controle (MC CT).



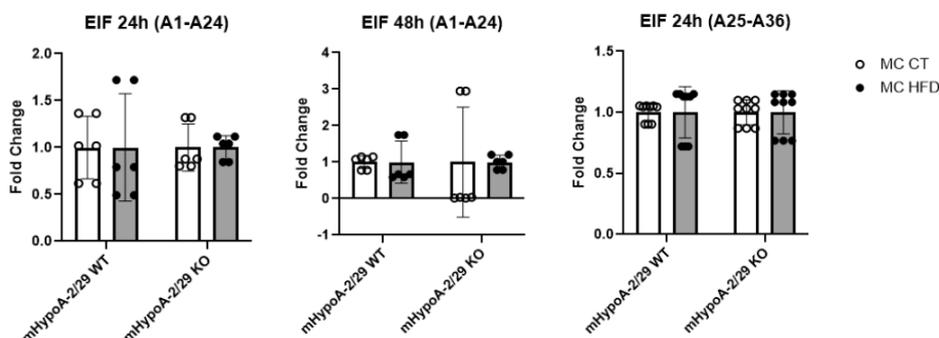
**Figura 2:** Expressão gênica de *Atf6* nas células mHypoA-2/29 WT e KO após tratamento em meio MC CT ou MC HFD por 24h ou 48h para as amostras A1 a A24 e 24h para as amostras A25 a A36 (conforme legenda).

Não houve aumento na expressão gênica de *Atf4* nas células mHypoA-2/29 KO e WT tratadas com MC HFD após 24h (Fig. 3A) e 48h (Fig. 3B) na primeira coleta e após 24h (Fig. 3C) na segunda coleta quando comparadas com as células tratadas MC CT.



**Figura 3:** Expressão gênica de *Atf4* nas células mHypoA-2/29 WT e KO após tratamento em meio MC CT ou MC HFD por 24h ou 48h para as amostras A1 a A24 e 24h para as amostras A25 a A36 (conforme legenda).

Por fim, não houve aumento na expressão gênica de *Eif* nas células mHypoA-2/29 KO e WT tratadas com MC HFD após 24h (Fig. 4A) e 48h (Fig. 4B) na primeira coleta e após 24h (Fig. 4C) na segunda coleta quando comparadas com as células tratadas MC CT.



**Figura 3:** Expressão gênica de *Eif* nas células mHypoA-2/29 WT e KO após tratamento em meio MC CT ou MC HFD por 24h ou 48h para as amostras A1 a A24 e 24h para as amostras A25 a A36 (conforme legenda).

## CONCLUSÕES:

Os estudos mais recentes sobre inflamação mostram que além da clássica inflamação aguda, citocinas pró-inflamatórias também são encontradas em indivíduos expostos continuamente a certos insultos, gerando uma inflamação crônica de baixo grau local e sistêmica. Entre esses insultos estão o excesso de ácidos graxos, que têm a capacidade de desencadear uma resposta inflamatória pela ativação de toll like receptors (TLR) assim como o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana de bactérias faz (FRITSCH, 2015). Quando animais são alimentados com quantidades lipídicas superiores às necessárias, há uma maior quantidade de citocinas pró inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, LPS, glicídios, insulina, triglicerídeos e colesterol na circulação sistêmica (GREGOR, 2011; TAKAHASHI & FUKUSATO, 2017).

Ademais, o processo inflamatório é um dos fatores que levam ao mal dobramento de proteínas e a resposta celular através da UPR. Esperava-se que nas células tratadas com o MC HFD houvesse aumento da expressão gênica da *Atf6*, *Atf4* e *Eif* em comparação com as células tratadas com MC CT e que esse aumento fosse mais expressivo nas células com a deleção do receptor  $\alpha 7nAChR$ , uma vez que um dos receptores que ativam a via colinérgica anti-inflamatória não estaria mais presente e assim não haveria inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por essa via.

No entanto, isso não foi observado nas análises por meio do RT-qPCR. Tanto as células mHypoA-2/29 WT quanto às KO tratadas com MC HFD não apresentaram aumento da expressão gênica dos alvos quando comparadas com as células mHypoA-2/29 WT e KO tratadas com MC CT. Tal resultado se opõe ao esperado mediante análise da literatura, por isso seria interessante uma repetição do tratamento das células com os meios condicionados para obter uma terceira coleta e análise da expressão gênica. Também seria interessante, em trabalhos futuros, que uma análise do soro dos animais fosse realizada para avaliação da ausência ou presença de citocinas inflamatórias no mesmo e testes na presença de agonistas seletivos do receptor  $\alpha 7nAChR$ .

## BIBLIOGRAFIA:

ALMANZA, A. et al. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*, n. 288, p. 241–278, 2018.

COX, A. J.; WEST, N. P.; CRIPPS, A. W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, v. 3, n. 3, p. 207–215, mar. 2015.

FRITSCHKE, K. L. The Science of Fatty Acids and Inflammation. *Advances in Nutrition*, v. 6, n. 3, p.293S, 2015.

FUCILE, S. The Distribution of Charged Amino Acid Residues and the Ca<sup>2+</sup> Permeability of Nicotinic Acetylcholine Receptors : A Predictive Model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 10, p. 1–10, 2017.

GIASTAS, P.; ZOURIDAKIS, M.; TZARTOS, S. J. Understanding structure-function relationships of the human neuronal acetylcholine receptor: insights from the first crystal structures of neuronal subunits. *British Journal of Pharmacology*, v. 175, n. 11, p. 1880–1891, 1 jun. 2018.

GOTTI, C.; CLEMENTI, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, v. 74, n. 6, p. 363–396, dez. 2004.

GREGOR, Margaret. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Reviews*, [s. l.], 3 jan. 2011. DOI 10.1146/annurev-immunol-031210-101322. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>. Acesso em: 7 mar. 2024.

HUMMASTI, Sarah; S. HOTAMISLIGIL, Gökhan. Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation in Obesity and Diabetes. *AHA Journals*, [s. l.], 3 set. 2010. DOI <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.225698>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/circresaha.110.225698>. Acesso em: 21 fev. 2024.

MINIHANE, A. M.; VINOY, S. et al. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition*, v. 114, n. 7, p. 999–1012, 14 out. 2015.

OAKES, S. A.; PAPA, F. R. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annual review of pathology*, v. 10, p. 173, 1 jan. 2015.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 8, n. 12, p. 743–754, 21 dez. 2012.

SHIVAPPA, N.; HEBERT, J. R. et al. Association between dietary inflammatory index and inflammatory markers in the HELENA study. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 61, n. 6, p. 1600707, 1 jun. 2017.

SANTUCCI, L. F. et al. Resposta inflamatória hipotalâmica em um modelo de sepse induzida por cirurgia de ligadura e punção cecal (CLP) após curta exposição à dieta hiperlipídica. Rev. trab. Iniciaç. Cient. UNICAMP, 2018.

SILVA Valkiria. Avaliação do potencial pró-inflamatório induzido por lipopolissacarídeo, combinado ou não com o ácido graxo saturado palmitato, em linhagem celular de micróglias: Estudo In Vitro da relação obesidade, inflamação e sistema nervoso central. USP Instituto de Saúde e Sociedade Curso de Nutrição, 2021

SKELDON, A. M. et al. Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. Immunology and Cell Biology, v. 92, n. 4, p. 304–313, 1 abr. 2014.

SOZEN, E.; KARTAL OZER, N. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review. Redox Biology, v. 12, p. 456–461, 2017.

OAKES, S. A.; PAPA, F. R. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. Annual review of pathology, v. 10, p. 173, 1 jan. 2015.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 39, n. 1, p. 44–84, 1 jan. 2007

OAKES, S. A.; PAPA, F. R. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. Annual review of pathology, v. 10, p. 173, 1 jan. 2015.

VELLOSO, L.A., TORSONI, M.A., ARAÚJO, E.P. "Hypothalamic Dysfunction in Obesity" Reviews in the Neurosciences, v. 20, n. 5-6, 2009, p. 441-449.