

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA À DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS QUE PODEM MODULAR A EXPRESSÃO DO RECEPTOR $\alpha 7$ NACHR EM CÉLULAS HIPOTALÂMICAS

Palavras-Chave: HIPOTÁLAMO-1, $\alpha 7$ NACHR -2, DIETA HIPERLIPÍDICA-3

MELISSA SANTOS DE AGUIAR – UNICAMP

ÍISIS DE CÁSSIA ALVES MARTINS (coorientadora e doutoranda)- UNICAMP

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

INTRODUÇÃO:

O hipotálamo é um dos principais centros reguladores da homeostase energética e o controle do balanço energético é profundamente prejudicado por processos inflamatórios que danificam a sinalização hipotalâmica, podendo resultar no desenvolvimento de desordens metabólicas. Nesse sentido, a subunidade alfa 7 do receptor nicotínico colinérgico ($\alpha 7$ nAChR) expressa em neurônios hipotalâmicos parece modular a expressão de neuropeptídeos que favorecem o balanço energético negativo, como a pró-opiomelanocortina (POMC). O $\alpha 7$ nAChR é uma subunidade homopentamérica e atua como um canal iônico seletivo de cálcio. Inicialmente esse receptor foi descrito por seu papel relevante na resposta anti-inflamatória colinérgica. Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que apenas 3 dias de exposição a dieta hiperlipídica foi capaz de reduzir o conteúdo proteico e de mRNA desse receptor no hipotálamo de camundongos e de tornar esse hipotálamo mais susceptível a danos inflamatórios.

A expressão e atividade do receptor $\alpha 7$ nAChR depende de vários mecanismos celulares que podem atuar estimulando ou inibindo a expressão do gene *Chrna7*, ou ainda controlando a presença e atividade do receptor na membrana celular. Dentre os mecanismos pré transcricionais, existem os fatores de transcrição, como o EGR-1, que possui ação inibitória em relação a expressão do receptor. Outro mecanismo pré transcricional que tem sido investigado é o processo de metilação do DNA, que consiste na redução da exposição da cromatina, tornando-a de mais difícil acesso para a transcrição. Dentre os mecanismos pós-traducionais, há a maturação da estrutura proteica do receptor $\alpha 7$ nAChR, que envolve proteínas chaperonas como RIC3 e NACHO. Com isso, o presente estudo investigou os efeitos da exposição aguda à dieta hiperlipídica sobre mecanismos epigenéticos relacionados ao receptor $\alpha 7$ nAChR em células hipotalâmicas.

METODOLOGIA:

Todos os procedimentos descritos abaixo estarão em acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovação prévia do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA 6292-1/2023) da Universidade Estadual de Campinas. Foram utilizados para o experimento camundongos *Mus musculus* (machos) da linhagem C57 que foram obtidos do biotério central da UNICAMP (CEMIB) com 8 semanas de idade e foram mantidos no biotério da FCA-UNICAMP em microisoladores individuais (Alesco®, SP, Brasil) com acesso a água e ração e ciclo de luz (claro/escuro) de 12 horas a temperatura controlada ($21\pm 1^\circ\text{C}$). Os camundongos foram designados para um grupo controle ou um grupo submetido a uma dieta rica em gordura e calorias por 3 dias (DHH; 45% kcal de lipídios). Ao final da intervenção dietética, os animais foram sacrificados e amostras de soro e hipotálamo foram coletadas. O soro, foi utilizado para o tratamento de células mHypoA-POMC/GFP e então foi avaliada a expressão gênica de PPAR-G e EGR-1 e o conteúdo proteico de RIC3 e H3. Foi avaliado no hipotálamo a expressão gênica de: $\alpha 7\text{nAChR}$, das chaperonas (RIC3 e NACHO), das DNA-metiltransferases (DNMT3a e 3b) e da histona desacetilase 3 (HDAC3) pela técnica de RT-qPCR. A análise estatística foi realizada usando média \pm erro padrão da média e avaliada por meio de teste T, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. Resultados da avaliação de mRNA do tecido hipotalâmico de animais expostos a dieta hiperlipídica por 3 dias.

1.1 Avaliação da expressão de mRNA do *Chrna7*

O $\alpha 7\text{nAChR}$ é um importante receptor relacionado com a via anti-inflamatória colinérgica (Seong et al, 2019) e atualmente estudos têm demonstrado seu envolvimento também com a homeostase energética hipotalâmica (Souza et al, 2019). Como pode ser observado na Fig.1 a exposição aguda à dieta hiperlipídica (3 dias), reduziu a expressão do $\alpha 7\text{nAChR}$. Dessa forma, assim como Souza et al mostraram (2019), apenas 3 dias de dieta foi capaz de diminuir o conteúdo de mRNA do *Chrna7* no hipotálamo (Figura 1).

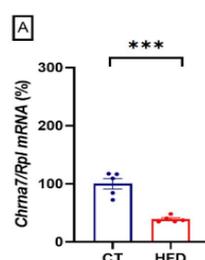


Figura 1. Avaliação da expressão gênica receptor $\alpha 7\text{nAChR}$ no hipotálamo de camundongos submetidos a HFD por 3 dias. Os camundongos C57 receberam 3 dias de dieta controle (CT) ou dieta hiperlipídica (HFD) (A) *Chrna7* CT n=5, HFD n=5. A quantidade de mRNA foi normalizada pelo endógeno Rpl7. As barras representam a média do grupo e \pm o erro padrão da média

1.2 Avaliação da expressão de mRNA de fatores pré e pós transcricionais relacionados com a diminuição de *Chrna7*

Conforme proposto, buscamos investigar mecanismos pré transcricionais que podem estar envolvidos com a diminuição da expressão do $\alpha 7nAChR$. Iniciamos as análises com a avaliação da expressão das enzimas DNA-Metiltransferases 3A e 3B (DNMT3A e DNMT3B) - enzimas responsáveis pela adição do radical metil a fita de DNA, tornando-a inacessível para a transcrição (Dyrvig et al, 2019). Conseguimos observar um aumento da expressão do mRNA de Dnmt3a e uma tendência de aumento de Dnmt3b (Figura 2C e 2D) – dado que vai de acordo com os achados de Jacobsen et al (2012) que mostraram que a curta exposição a dieta hiperlipídica pode modular a metilação, afetando genes principalmente envolvidos na inflamação. A região promotora do gene *Chrna7* é rica em ilhas de CpG (Canastar et al, 2012), local que possui alta proporção de pares de base formados por guanina e citosina, sendo alvo de enzimas metiltransferases. Assim, o aumento de Dnmt3a pode estar interferindo na transcrição de *Chrna7*.

Além do mecanismo de metilação do DNA, outro mecanismo pré transcricional que pode estar envolvido em nosso modelo é a desacetilação de histonas, mecanismo que retira o grupo acetil de resíduos de acetil-lisina nas caudas amino-terminais das histonas, mediando assim a repressão transcricional (Lee et al, 2021). Nakamura e colaboradores (2020) mostraram, utilizando uma linhagem de micróglia (BV-2), que o tratamento com LPS foi capaz de diminuir a expressão de $\alpha 7nAChR$ através do aumento e ação da *Hdac3*. Com isso, analisamos a expressão da Histona deacetilase 3 (*Hdac3*) no hipotálamo dos camundongos que receberam 3 dias de dieta hiperlipídica. Embora não significativos, observamos uma tendência de aumento na expressão dessa enzima, sugerindo que esse mecanismo também possa estar ativo e envolvido na redução da expressão do $\alpha 7nAChR$ (Figura 2E).

Em relação aos mecanismos pós traducionais, iniciamos as análises com a avaliação das chaperonas (*Ric3* e *NACHO*) relacionadas com o enovelamento (folding) do $\alpha 7nAChR$. Observamos em nosso modelo a redução do gene *Ric3*, que codifica para a proteína *Ric3* e uma tendência de redução do gene *Tmem35*, que codifica para a proteína *NACHO* (Figura 2A e 2B). O estudo de Ben-David et al (2020) também mostrou que camundongos com esclerose múltipla (EM), uma doença neuroinflamatória, apresentaram redução no conteúdo de *Ric3*. Assim como a EM, o consumo de dieta hiperlipídica também é um estímulo neuroinflamatório por conter ácidos graxos saturados que são capazes de ativar TLR4 e resultar em uma resposta inflamatória (Milanski et al, 2009). Essa chaperona está diretamente relacionada com a expressão funcional do $\alpha 7nAChR$ (Gu et al, 2016).

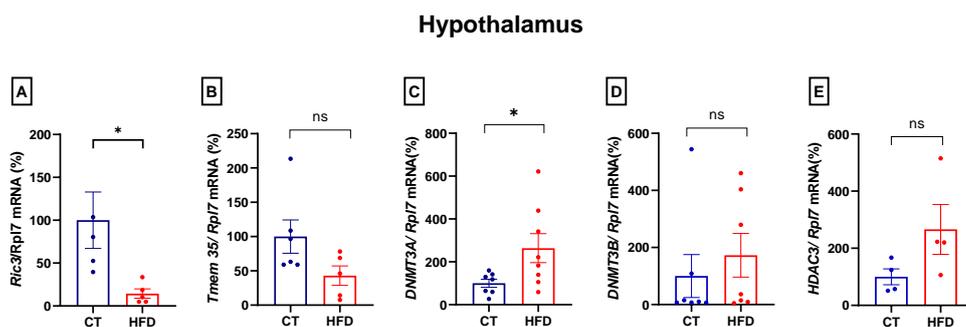


Figura 2. Avaliação da expressão gênica de genes relacionados a mecanismos pré e pós transcricionais do *Chrna7* no hipotálamo de camundongos submetidos a HFD por 3 dias. Os camundongos C57 receberam 3 dias de dieta controle (CT) ou dieta hiperlipídica (HFD) (A) *Ric3* CT n=5, HFD n=5. (B) *Tmen35* CT n=6, HFD n=5 (C) *Dnmt3a* CT n=7, HFD n=8. (D) *Dnmt3b* CT n=7, HFD n=7. (E) *Hdac3* CT n=4, HFD n=4. A quantidade de mRNA foi normalizada pelo endógeno *Rpl7*. As barras representam a média do grupo e \pm o erro padrão da média

2. Resultados da expressão de mRNA de células mHypoA-POMC/GFP tratadas com soro de animais expostos com dieta hiperlipídica por 3 dias.

2.1 Avaliação de fatores de transcrição relacionados a diminuição da expressão de *Chrna7*

Conforme mostrado por Simino e colaboradores (2023), o tratamento dessa linhagem neuronal com o soro de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica por 3 dias foi capaz de diminuir a expressão de *Chrna7*. Iniciamos os estudos deste modelo avaliando a expressão de fatores de transcrição relacionados com a transcrição de *Chrna7*. Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma da isoforma gama (PPARG), são fatores de transcrição nucleares induzíveis por ligantes que quando ativados por meio da ativação de outro fator de transcrição, EGR-1, promovem a redução da expressão do *Chrna7* (Hahn et al, 2014). Dessa forma, os resultados mostrados na figura 4 sugerem que células tratadas com soro de animais alimentados com dieta hiperlipídica aumentam os níveis de mRNA de ambos os genes, *Pparg* e *Egr-1* (Figura 4A e B), podendo interferir negativamente na expressão do *Chrna7*.

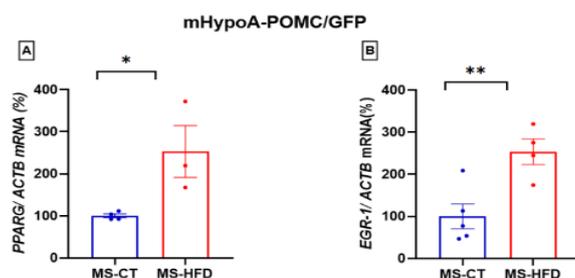


Figura 4. Avaliação da expressão de genes de fatores de transcrição relacionados ao *Chrna7* em linhagem celular POMC/GFP. A linhagem neuronal derivada de camundongo POMG/GFP foi tratada com 2% de soro de animais alimentados com dieta controle ou dieta hiperlipídica 45% por 3 dias. **MS-CT= Meio de cultura com soro de animal controle; MS-HFD= Meio de cultura com soro de animal alimentado com dieta hiperlipídica.** (A) *PPARG* MS-CT n = 4, MS-HFD n=3 (B) *EGR-1* MS-CT n = 5, MS HFD n=4. A quantidade de mRNA foi normalizada pelo endógeno *Rpl7*. As barras representam a média do grupo e \pm o erro padrão da média.

2.2 Avaliação do conteúdo proteico de proteínas relacionadas com mecanismos epigenéticos do *Chrna7*

Por fim, foi também analisado o conteúdo proteico das células tratadas. Foram avaliadas as proteínas RIC3 e H3 (Lys9), contudo, não foram observadas diferenças significativas.

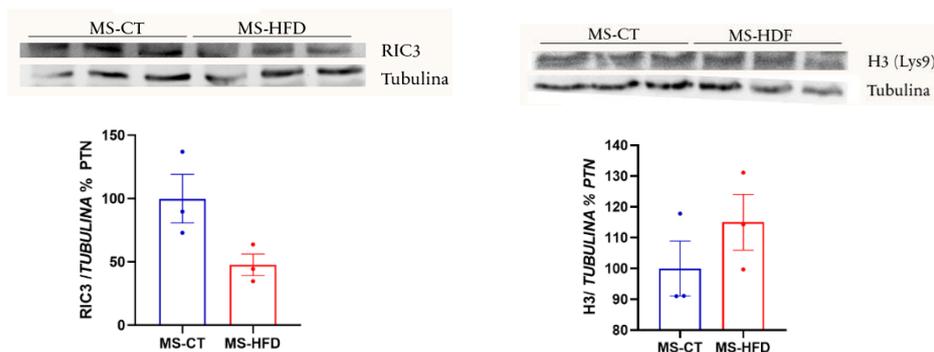


Figura 3. Avaliação do conteúdo proteico da chaperona RIC3 e da histona acetilada H3 (Lys9) em linhagem celular POMC/GFP. A linhagem neuronal derivada de camundongo POMG/GFP foi tratada com 2% de soro de animais alimentados

com dieta controle ou dieta hiperlipídica 45% por 3 dias. **MS-CT= Meio de cultura com soro de animal controle; MS-HFD= Meio de cultura com soro de animal alimentado com dieta hiperlipídica. (A) RIC3 MS-CT n = 3, MS-HFD n=3 (B) H3 MS-CT n= 3, MS-HFD n=3; triplicata técnica.** A quantidade de mRNA foi normalizada pelo endógeno *Rpl7*. As barras representam a média do grupo e \pm o erro padrão da média

CONCLUSÕES:

Até o momento, podemos observar que a exposição aguda à dieta hiperlipídica parece promover alterações, pré transcricionais e pós traducionais, no ambiente celular, que promovem a redução da expressão de proteínas relacionadas com a expressão funcional do $\alpha 7$ nAChR in vivo e in vitro. Posteriormente, continuaremos com as investigações necessárias para entender melhor as tendências observadas.

BIBLIOGRAFIA

- Ben-David, Y. et al. RIC3, the cholinergic anti-inflammatory pathway, and neuroinflammation. *International Immunopharmacology*, v. 83, p. 106381, 2020.
- Canastar, A. et al. Promoter methylation and tissue-specific transcription of the $\alpha 7$ nicotinic receptor gene, *CHRNA7*. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 47, n. 2, p. 389-400, 2012.
- Dyrvig, M. et al. DNA methylation regulates *CHRNA7* transcription and can be modulated by valproate. *Neuroscience Letters*, v. 704, p. 145- 152, 2019.
- Gu, S. et al. Brain $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor assembly requires NACHO. *Neuron*, v. 89, n. 5, p. 948-955, 2016.
- Hahn, S. et al. GW1929 inhibits $\alpha 7$ nAChR expression through PPAR γ independent activation of p38 MAPK and inactivation of PI3-K/mTOR: The role of Egr-1. *Cell Signal*, v. 4, p. 730-739, 2014
- Jacobsen, S.C. et al. Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia*, v. 55, n. 12, p. 3341-3349, 2012.
- Lee JH, Bollschweiler D, Schäfer T, Huber R. Structural basis for the regulation of nucleosome recognition and HDAC activity by histone deacetylase assemblies. *Sci Adv*. 2021 Jan 8;7(2):eabd4413. doi: 10.1126/sciadv.abd4413. PMID: 33523989; PMCID: PMC7793584.
- Milanski, M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 2, p. 359-370, 2009.
- Seong, J., Kang, JY, Sun, JS et al. Inflamação hipotalâmica e obesidade: uma revisão mecanística. *Arco. farm. Res.* 42, 383–392 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01138-9>
- Simino LAP, Baqueiro MN, Panzarin C, Lopes PKF, Góis MM, Simabuco FM, Ignácio-Souza LM, Milanski M, Ross MG, Desai M, Torsoni AS, Torsoni MA. Hypothalamic $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) is downregulated by TNF α -induced Let-7 overexpression driven by fatty acids. *FASEB J*. 2023 Sep;37(9):e23120. doi: 10.1096/fj.202300439RR. PMID: 37527279.
- Souza ACP, Souza CM, Amaral CL, et al. Short-term high-fat diet consumption reduces hypothalamic expression of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit ($\alpha 7$ nAChR) and affects the anti-inflammatory response in a mouse model of sepsis. *Front Immunol* 2019; 10: 1–15.
- Souza CM, Do Amaral CL, Souza SC, et al. JAK2/STAT3 pathway is required for $\alpha 7$ nAChR-dependent expression of POMC and AgRP neuropeptides in Male mice. *Cell Physiol Biochem* 2019; 53: 701–712.
- Nakamura Y, Kimura S, Takada N, Takemura M, Iwamoto M, Hisaoka Nakashima K, Nakata Y, Morioka N. Stimulation of toll-like receptor 4 downregulates the expression of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors via histone deacetylase in rodent microglia. *Neurochem Int*. 2020 Sep;138:104751. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104751. Epub 2020 May 13. PMID: 32413437.