

Influência do consumo de dieta hiperlipídica (HFD) na permeabilidade e inflamação do cólon de camundongos $\text{LyzMCre}^{+}\text{-}\alpha 7\text{F/F}$

Palavras-Chave: CÓLON, INFLAMAÇÃO, DIETA HIPERLIPÍDICA

Autores(as):

CATARINA MICHELONE, FCA – UNICAMP

Ma. CAROLINE LOBO COSTA (coorientadora), FCA - UNICAMP

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

INTRODUÇÃO:

As doenças inflamatórias intestinais (DII) tais como a Retocolite ulcerativa e a Doença de Crohn, tem alta prevalência e morbidade na população. Essas patologias apresentam etiologia multifatorial, porém os aspectos emocionais e nutricionais têm relação direta com a evolução das doenças (SHAMOON; MARTIN; O'BRIEN, 2019). Indicadores de inflamação comuns às DIIs são a presença de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da permeabilidade intestinal. Neste sentido, o estudo desenvolvido por Ghia et al. demonstrou a função protetora e anti-inflamatória do nervo vago em modelos murinos de colite aguda, assim como o papel dos receptores colinérgicos nicotínicos e de macrófagos nessa função (GHIA et al., 2006). Esse efeito anti-inflamatório com participação da via colinérgica é conhecido como via anti-inflamatória colinérgica e resulta na inibição da produção de citocinas através da ativação dos receptores $\alpha 7\text{nAChR}$ (DI GIOVANGIULIO et al., 2016; WANG et al., 2003).

Ademais, um estudo realizado por Jonge et al., demonstrou que a via JAK2-STAT3 mediada pela subunidade $\alpha 7$ em monócitos e macrófagos exerce um papel essencial sobre a função anti-inflamatória vagal. A via é ativada a partir da fosforilação de JAK2 pela acetilcolina derivada de neurônios eferentes vagais. Desta forma, JAK2 fosforila e ativa STAT3, que migra para o núcleo inibindo a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (JONGE et al., 2005).

Entretanto, alguns fatores são capazes de modular a expressão do receptor nicotínico colinérgico $\alpha 7$ ($\alpha 7\text{nAChRs}$), como por exemplo condições inflamatórias. O consumo de dietas ricas em gorduras, por sua vez, induz mudanças na microbiota que resultam em maior permeabilidade intestinal e levam a endotoxemia metabólica e inflamação (FRAZIER; DIBAISE; MCCLAIN, 2011). Estudos prévios do grupo indicam que o consumo de dieta hiperlipídica (HFD) é capaz de reduzir a expressão do receptor $\alpha 7\text{nAChR}$ e potencializar a resposta inflamatória (SOUZA et al., 2019).

Portanto, o estudo tem como objetivo avaliar o efeito do consumo de HFD na permeabilidade, na expressão de proteínas de junção e inflamação do cólon de camundongos com a deleção do receptor $\alpha 7\text{nAChR}$ em células de origem mielóide.

METODOLOGIA:

Animais:

Foram utilizados animais machos com 6 semanas de vida da linhagem $\text{LyzMCre}/\alpha 7\text{nAChR-FLOX}$ ($\text{LyzMCre}^{+}\text{-}\alpha 7\text{F/F}$) que foram obtidos pelo cruzamento de B6(Cg)- $\text{Chrna}7\text{tm}1.1\text{Ehs/YakelJ}$ (n. 026965 JAX) com B6.129P2- $\text{Lyz}2\text{tml}(\text{cre})\text{lf0/J}$ (n. 018956 JAX) obtidos do *Jackson Laboratory* nos EUA. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP) em estantes ventiladas, com temperatura da sala de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas e com água e ração ad libitum. O sucesso na alteração genética é certificado através da genotipagem de cada animal. A genotipagem é realizada logo após o desmame, utilizando *primers* específicos de acordo com as instruções da THE JACKSON LABORATORY para cada linhagem (www.jax.org).

Todos os procedimentos descritos neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP) sob protocolo de n.º: 5386-1/2019 e 5751-1/2021. Os animais serão

randomicamente distribuídos nos grupos experimentais descritos na figura 1, de acordo com a manipulação dietética.

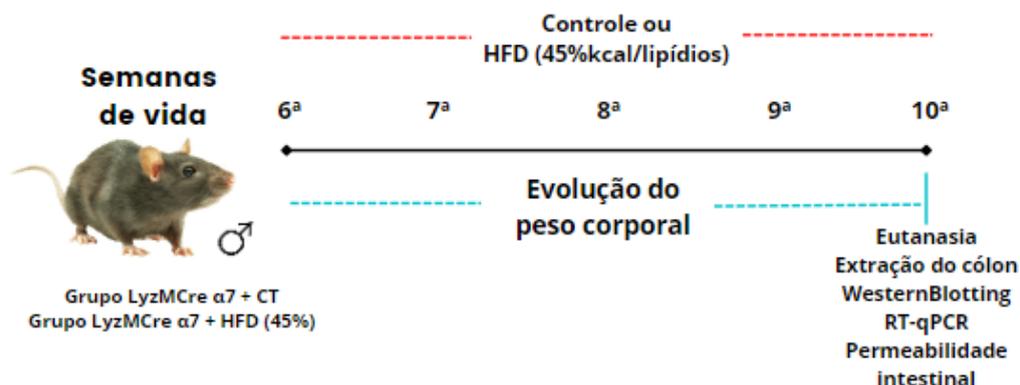


Figura 1. Desenho experimental do presente estudo (Fonte: O autor, 2023).

Dieta experimental:

A dieta ofertada aos animais durante 4 semanas foi preparada no laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA). A quantidade dos nutrientes e do valor calórico serão ajustados a partir de uma dieta controle, visando aumentar a densidade calórica e o fornecimento de lipídios, assim como sua fonte. Como produto final, foi obtida uma dieta hiperlipídica (45%) a partir da adição de fonte alimentar rica em gordura saturada (banha de porco). A composição da dieta hiperlipídica que foi utilizada durante os experimentos, assim como a comparação dos ajustes realizados a partir da dieta padrão é mostrado na tabela I.

Ingredientes	Dieta Padrão(g%)	Dieta Hiperlipídica 45% (g%)
Carboidrato	66	44
Fonte Proteica	20	20
Lipídios	4	23
Fibras	5	5
Minerais	3,5	3,5
Vitaminas	1	1
L-cistina	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Calorias de gordura (%/100g)	9	45
Valor calórico (KJ/100g)	1591	1939

Tabela I. Tabela comparativa da composição nutricional da dieta hiperlipídica e da dieta padrão utilizadas durante os experimentos.

Expressão proteica por Western blotting e Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR:

Os cólons foram coletados para as análises de *Western Blotting* e RT-qPCR. O conteúdo protéico obtido do processamento do cólon, foi avaliado através do *Western Blotting* com os seguintes anticorpos específicos: Ocludina, ZO-1, Claudina 1 e 2. Para avaliação da quantidade de transcrito de mRNA e inferência de estímulo para a expressão foram empregadas a técnica de real-time PCR (qRT-PCR). A expressão relativa foi determinada usando os seguintes primers: TNF, IL-1B e IL-10 e proteínas de permeabilidade (Ocludina, ZO-1, Claudina 1 e 2), com o sistema de detecção TaqMan para os genes alvo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Inicialmente, para avaliar a expressão gênica das proteínas de junção da barreira intestinal do cólon em camundongos utilizamos um modelo animal alternativo que apresenta a deleção do receptor $\alpha 7nAChR$ no corpo inteiro *Chrna7^{-/-}* (*B6.129S7-Chrna7tm1Bay/J*) Estes resultados mostraram que a deleção não promoveu mudança da quantidade de nenhuma das proteínas de junção avaliadas (Fig.2). No entanto, a associação com a HFD

impediu o aumento de claudina1. O mesmo grupo apresentou redução da expressão de Claudina1 quando comparado ao grupo WT+HFD que teve um aumento significativo se comparado ao grupo WT+CT (Fig.2 B). Em relação à expressão de Ocludina, não houve diferença significativa entre os grupos (Fig.2 C). A expressão gênica de Tjp1 (ZO1) mostrou uma redução no grupo KO α 7+HFD comparado com os grupos KO α 7+CT e WT+HFD (Fig.2 D). Também avaliamos a expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL10 e não observamos diferença significativa entre os grupos (Fig.2 E).

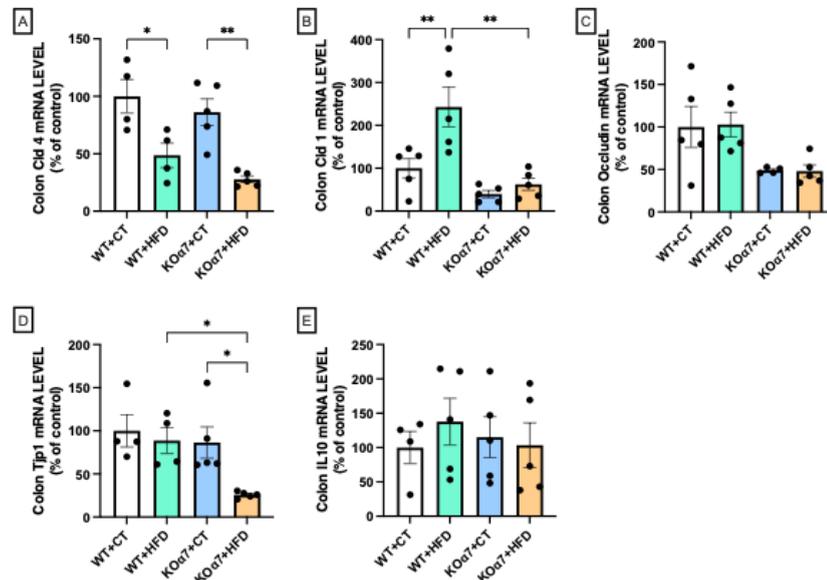


Figura 2. Expressão gênica das proteínas de junção e IL10. (A) mRNA level (qRT-PCR) de Cld4 do cólon, (B) mRNA level (qRT-PCR) de Cld1 do cólon, (C) mRNA level (qRT-PCR) de Occludin do cólon, (D) mRNA level (qRT-PCR) de Tjp1 do cólon e (E) mRNA level (qRT-PCR) de IL10 do cólon. N=5/grupo. O ACTB foi usado como controle endógeno. Resultados apresentados em média \pm E.P.M. ANOVA, *p < 0.05 e ** p < 0.01.

Os camundongos *Chrna7*^{-/-} apresentaram diferença significativa da expressão das proteínas de junção do cólon comparados ao grupo WT, ambos com dieta controle. O animal *Chrna7*^{-/-} mostrou níveis proteicos de ZO1 (142%), Ocludina (163%) e Claudina 2 (234%) maiores, comparado ao WT (Fig.3 A, B e C). Entretanto no grupo KO α 7+HFD os níveis proteicos de Claudina 2 (230%) foram reduzidos no cólon, comparado com os animais KO α 7+CT (Fig.3 C). Contudo, os níveis proteicos da Claudina 1 não foram significativamente diferentes entre os grupos (Fig.3 D), como pode-se observar na imagem representativa (Fig.3 E).

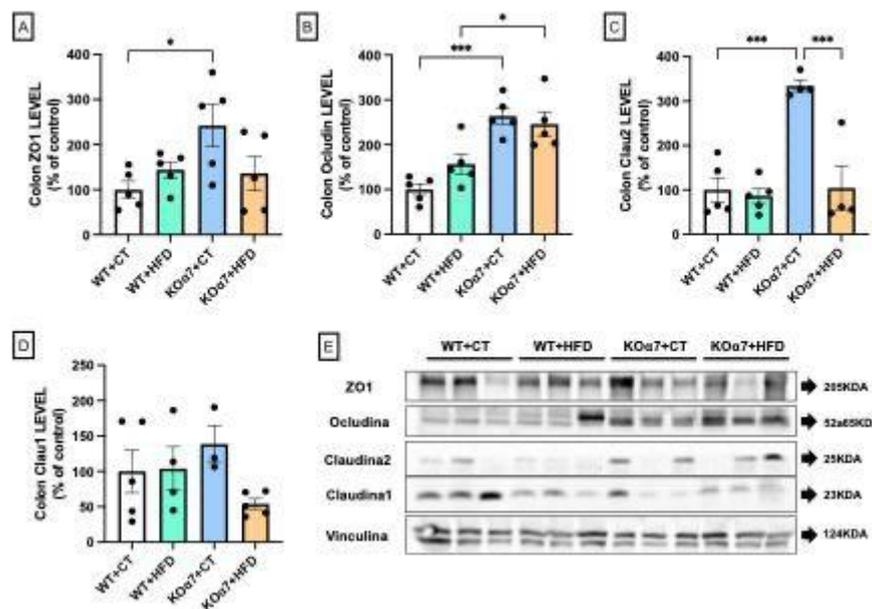


Figura 3. Níveis das proteínas de junção. (A) ZO1 level do cólon, (B) Occludin level do cólon, (C) Cld2 level do cólon, (D) Cld1 level do cólon e (E) Imagem representativa das bandas de Western Blot. N=5/grupo. One-way ANOVA, *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Portanto, realizamos a avaliação da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL1B do cólon de camundongos Wild Type e *Chrna7*^{-/-} que receberam dieta controle e que receberam dieta hiperlipídica. Tanto os camundongos WT quanto os *Chrna7*^{-/-} que receberam dieta hiperlipídica apresentaram um aumento significativo da expressão de TNF (Fig.4 A). Os camundongos WT + HFD apresentaram uma maior expressão de IL1B quando comparados aos WT que receberam dieta controle (Fig.4 B). Porém, os *Chrna7*^{-/-} que receberam dieta controle apresentaram uma maior expressão de TNF e uma tendência no aumento de IL-1B quando comparados aos camundongos WT controle (Fig. 4A e B). Esses resultados sugerem que, tanto o consumo de dieta hiperlipídica quanto a deleção do receptor $\alpha 7$ nAChR são possíveis fatores capazes de produzir um efeito pró-inflamatório.

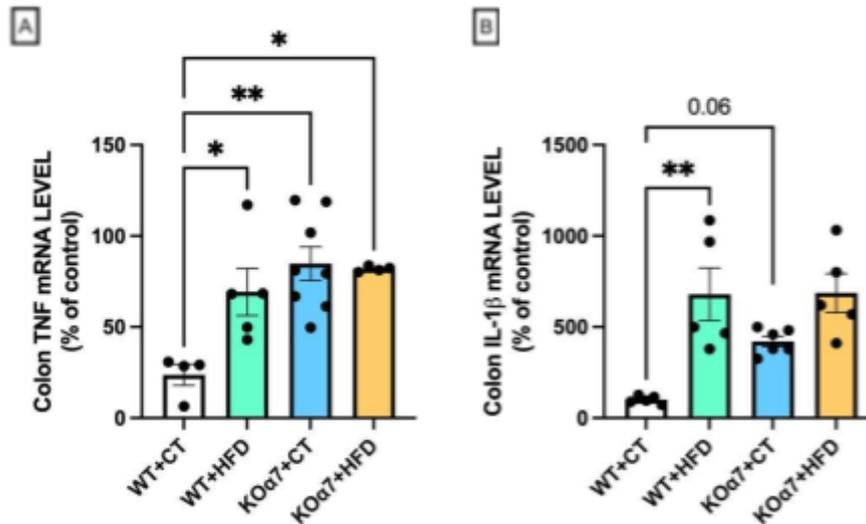


Figura 4. Expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias (A) mRNA level (qRT-PCR) de TNF do cólon e (B) mRNA level (qRT-PCR) de IL-1B do cólon. O ACTB foi usado como controle endógeno. Resultados apresentados em média \pm E.P.M. ANOVA, * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$,

Baseado nesses resultados anteriores com animais knockout para o receptor $\alpha 7$, nos propusemos a realizar essas análises em camundongos com deleção do receptor $\alpha 7$ nAChR especificamente em células de origem mielóide (camundongos *LyzMCre*⁺- $\alpha 7$ ^{F/F}). Com esse modelo buscamos avaliar se a deleção nestas células associada ao consumo de dieta hiperlipídica, produz efeitos semelhantes aos que foram observados no cólon dos camundongos *Chrna7*^{-/-}, isto é, com deleção no corpo inteiro.

Foram efetuados os procedimentos de extração de DNA e genotipagem a partir da ponta da cauda dos camundongos recebidos para confirmar que tratavam-se de animais *LyzMCre*⁺ (Fig.5).

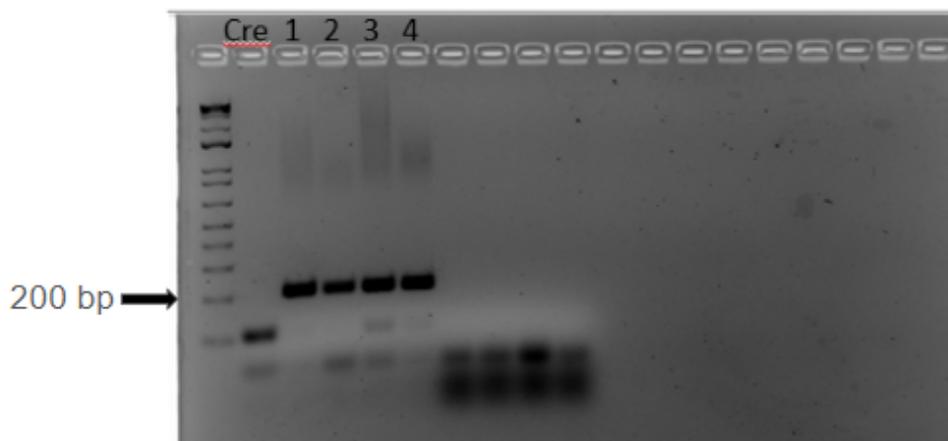


Figura 5. Genotipagem animais *LyzMCre*⁺ recebidos do CEMIB. Cre: água; 1: macho número 1 *LyzMCre*⁺; 2: macho número 2 *LyzMCre*⁺; 3: fêmea número 3 *LyzMCre*⁺; 4: fêmea número 4 *LyzMCre*⁺. Data de nascimento dos animais: 10 de maio de 2023. Seta: aponta para a banda de altura 200 bp.

Em seguida, iniciou-se o cruzamento dos animais LyzMCre⁺ com animais $\alpha 7$ nAChR-FLOX para obter os animais de interesse (LyzMCre⁺- $\alpha 7$ F/F) do projeto, os quais possuem a deleção dos receptores colinérgicos nicotínicos de acetilcolina do tipo $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) em células de origem mielóide. Posteriormente, realizamos a genotipagem dos animais obtidos a partir desse cruzamento (Fig.6).

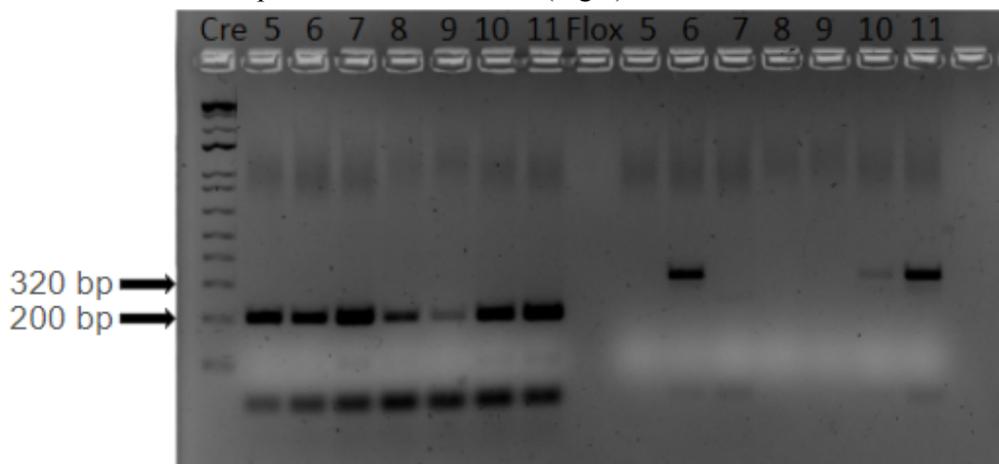


Figura 6. Genotipagem do cruzamento de animais LyzMCre⁺/ $\alpha 7$ nAChR-FLOX. Animais 5 a 11: LyzMCre⁺ e Animais $\alpha 7$ nAChR-FLOX; animal número 5: LyzMCre⁺- $\alpha 7$ F/F⁻; animal número 6: LyzMCre⁺- $\alpha 7$ F⁺/F⁺; animal número 7: LyzMCre⁺- $\alpha 7$ F⁻/F⁻; animal número 8: LyzMCre⁺- $\alpha 7$ F⁻/F⁻; animal número 9: LyzMCre⁺- $\alpha 7$ F⁻/F⁻; animal número 10: LyzMCre⁺- $\alpha 7$ F⁺/F⁺; animal número 11: LyzMCre⁺- $\alpha 7$ F⁺/F⁺. Setas apontam para as bandas de 200 e 320 bp.

A presença da banda na altura 200 bp (Fig.5 e 6) indica a presença do fragmento DNA correspondente à enzima Cre recombinase, a qual reconhece sítios específicos do DNA denominados *LoxP* e é capaz de provocar uma deleção, inversão ou translocação do gene localizado entre dois sítios *LoxP*.

Já na figura 6, a presença das bandas em 320 bp indica que há sequências de DNA flanqueadas por sítios de recombinação *Lox*, permitindo a manipulação controlada do gene alvo na presença da enzima Cre.

Apesar de os cruzamentos terem sido bem sucedidos, encontramos problemas na expansão dos animais LyzMCre⁺- $\alpha 7$ F/F dessa linhagem, pois os animais apresentaram baixa taxa de sobrevivência, bem como, baixa quantidade de fêmeas nascidas, prejudicando o cruzamento.

CONCLUSÕES:

Os resultados sugerem que o consumo de dieta hiperlipídica contribui para o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e para a redução da expressão de proteínas de junção do cólon de camundongos *Chrna7*^{-/-}. Contudo, não foi possível realizar as análises em animais LyzMCre⁺- $\alpha 7$ F/F devido a problemas na manutenção dessa linhagem.

BIBLIOGRAFIA

- DI GIOVANGIULIO, M. et al. **Vagotomy affects the development of oral tolerance and increases susceptibility to develop colitis independently of α -7 nicotinic receptor.** *Molecular Medicine*, v. 22, n. 8, p. 464–476, 2016.
- GHIA, J. E. et al. **The Vagus Nerve: A Tonic Inhibitory Influence Associated With Inflammatory Bowel Disease in a Murine Model.** *Gastroenterology*, v. 131, n. 4, p. 1122–1130, 2006.
- SHAMOON, M.; MARTIN, N. M.; O'BRIEN, C. L. **Recent advances in gut Microbiota mediated therapeutic targets in inflammatory bowel diseases: Emerging modalities for future pharmacological implications.** *Pharmacol Res*, v. 148, n. 104344, 2019.
- JONGE, W. J. DE et al. **Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway.** v. 6, n. 8, p. 844–852, 2005.
- WANG, H. et al. **Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation.** *Nature*, v. 421, n. 6921, p. 384–388, 2003.
- SOUZA, A. C. P. 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.** v. 10, n. March, p. 1–15, 2019.
- FRAZIER, T. H.; DIBAISE, J. K.; MCCLAIN, C. J. **Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury.** *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 35, n. 5 SUPPL., p. 14–20, 2011.