

Avaliação do Potencial de Aplicação do Butirato como Fator Redutor dos Processos Inflamatórios em Camundongos C57BL/6.

Palavras-Chave: Butirato, Microbiota, Inflamação

*Brenda Silva Rodrigues, FCM/UNICAMP
*Ana María Yukie Sasajima, FCM/UNICAMP
Mariana Favaretto Martins, PUC-Campinas
Larissa Shinju Hiratsuka UNIFESP-SJC
Dioze Guadagnini, FCM/UNICAMP
Dra. Heloisa Balan Assalin, FCM/UNICAMP
Profa. Dra. Dayane Batista Tada, UNIFESP-SJC
Dra. Daniéla Oliveira Magro, FCM/UNICAMP
Prof. Dr. Mario Jose Abdalla Saad, FCM/UNICAMP
Dr. Andrey Santos (Orientador), FCM/Unicamp
*Estes autores contribuem igualmente.

O avanço da industrialização e o aumento do consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura, junto com um baixo consumo de fibras, têm destacado a importância da saúde intestinal¹. A microbiota, composta por trilhões de microrganismos no sistema digestivo, é crucial para a nossa saúde. As fibras promovem o crescimento de bactérias benéficas no intestino, resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) como o butirato (SBt), que possui propriedades anti-inflamatórias e fortalece a imunidade¹. O SBt é eficaz na redução da inflamação crônica, que pode causar problemas de saúde como MASH, diabetes e obesidade. Este projeto investiga como a adição desses compostos a uma dieta rica em açúcares e gorduras pode combater a inflamação.

Metodologia:

A encapsulação de Butirato em HEC pelo método de gelificação iônica. Essa etapa foi realizada em parceria com o grupo de pesquisa Nanomateriais & Nanotoxicologia do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNIFESP, coordenado pela Profa. Dra. Dayane Batista Tada.

Preparação Das Dietas

A dieta utilizada como base para as intervenções alimentares no experimento é conhecida como "dieta de cafeteria" ou "dieta ultraprocessada", a qual replica os padrões alimentares frequentemente observados na sociedade humana, especialmente em países ocidentais. Esta dieta consiste em uma seleção de alimentos ricos em gordura, carboidratos e baixa quantidade de fibras presentes nos hábitos alimentares. No contexto deste estudo, a composição específica da dieta de cafeteria foi estabelecida na seguinte proporção:

Alimento	Porcentagem
Ração Nuvilab	37,5%
Bolacha Maisena	12,5%
Amendoim Torrado	25%
Chocolate ao Leite em barra	25%

Tot Totalizando cerca de 3,8 Cal/g em oposição a aproximadamente 1,8 Cal/g da dieta de ração padrão. Os alimentos foram triturados com o auxílio de um processador de alimentos (Walita Ri3155) (Figura 1).



Figura 1. Processamentos da dieta

A inserção dos compostos associados à dieta de cafeteria seguiu as proporções indicadas:

- Dieta de Cafeteria + HEC: adição de 5g de hec a cada 100g de dieta;
- Dieta de Cafeteria + Butirato com HEC: adição de 5g de butirato com hec a cada 100g de dieta;
- Dieta de Cafeteria + Fibra: adição de 6g de fibra a cada 100g de dieta.

Tratamento dos animais

Camundongos C57BL/6 foram divididos em 6 grupos (n=5): grupo A (controle) recebeu dieta padrão (DP); grupo B foi tratado com dieta de cafeteria (DC) suplementada com biopolímero sem SBT; grupo C (BUTHEC) foi tratado com DC suplementado com SBT (8g/kg/animal); grupo D (FIBRA) foi tratado com DC suplementado com fibra (9,6g/kg/animal). Os animais foram pesados semanalmente e a glicemia determinada por glicosímetro através de amostras de sangue coletadas da cauda. Após 60 dias de tratamento, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com Tiopental Sódico (40 mg/kg) até a perda dos reflexos podal e corneano. Após a perda dos reflexos, foram coletados fígado, tecido adiposo marrom, intestinos delgado e grosso, fezes e sangue total. Após a extração dos tecidos, os animais foram sacrificados com uma overdose de anestésico. (CEUA do protocolo 6323-1/2023)

q.PCR

O RNA total foi obtido do íleo de ambos os grupos de camundongos usando o RNeasy Mini Kit da Qiagen conforme descrito no protocolo do fabricante (Qiagen Inc, CA, EUA). Para amostras de tecido, o cDNA da primeira fita foi sintetizado usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade conforme descrito no protocolo do fabricante (Applied Biosystem, CA, EUA). Foram analisados os níveis de expressão relativa dos genes: Alpi, Ffar2, Ffar3, Glut2 e Tjp1. A expressão de Gapdh e beta Actina foram utilizadas como controle endógeno e amostras de camundongos controle foram usadas como calibradores.

Resultados

Ganho de peso e consumo da dieta

Os animais foram avaliados quanto ao consumo e ganho de peso semanalmente durante 12 semanas. O grupo CTL não foi possível avaliar consumo. O consumo foi avaliado de forma indireta, calculando-se o delta da massa da ração a cada ± 3 dias (Massa da ração final (g) – Massa da Ração inicial (g)) e o valor dividido pelo número de animais na caixa..

$$\text{Consumo} = \frac{[\text{Massa da ração final(g)} - \text{Massa da Ração inicial (g)}]}{\frac{n(\text{animais na caixa})}{\text{dias}}}$$

O grupo BUTHEC apresentou um maior consumo de dieta com relação aos demais grupos (BUTHEC vs CF $p=0,0038$; BUTHEC vs FIBRA $p = 0,00385$). No entanto, o grupo BUTHEC teve um menor ganho de peso em relação ao grupo FIBRA ($p=0.0326$) (Figura 2)

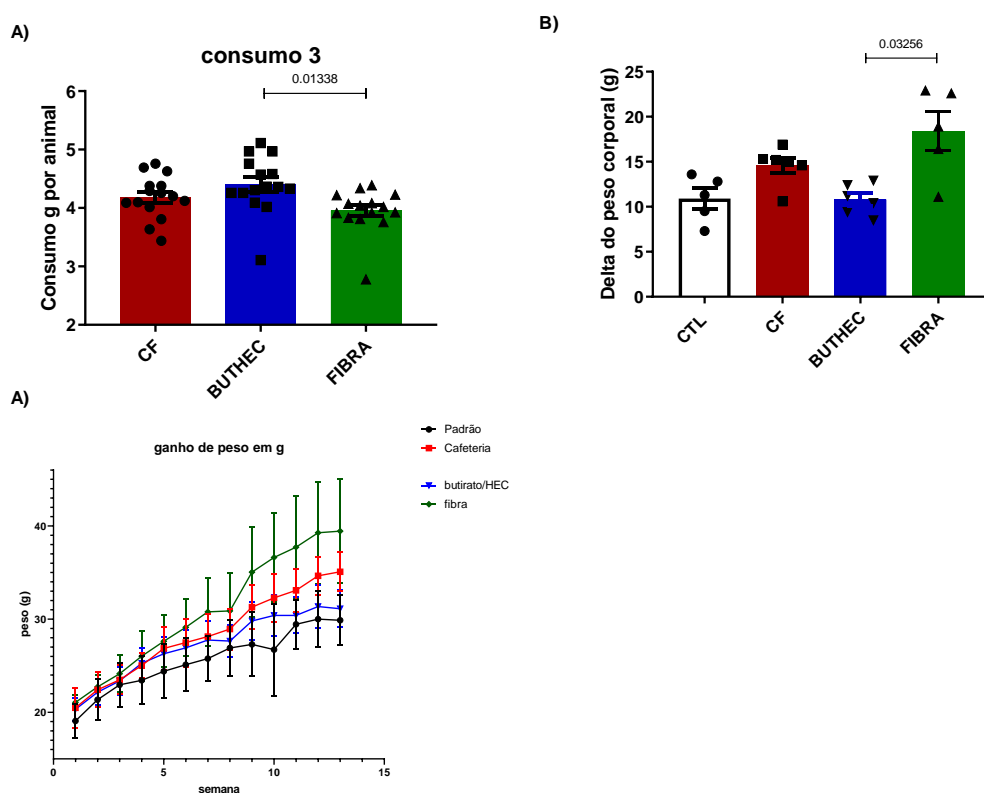


Figura 2. Consumo e ganho de peso. A) Consumo da dieta por animal em g; B) Delta do ganho de peso por animal; C) Curva do ganho de peso por animal por semana . Os dados são expressos como média \pm desvio padrão comparações estatísticas one-way ANOVA.

qPCR

Nossos resultados demonstram que a suplementação com fibra ou butirato induziu, no íleo, a expressão dos genes *Alpi*, *Ffa2* e *Ffa3* quando comparado com o grupo CF (CF vs FIBRA: *Alpi* $p=0,03826$; *Ffa2* $p=0,0017$ e *Ffa3* $p=0,0086$; CF vs BUTHEC: *Alpi* $p=0,03826$; *Ffa2* $p=0,0419$ e *Ffa3* $p=0,0136$). O butirato também induziu a expressão dos genes *Tjp1* e *Glut2* quando comparado com o grupo CF (CF vs BUTHEC: *Tjp1* $p=0,0329$; *Glut2* $p=0,0299$). No fígado, a suplementação com butirato inibiu a expressão dos genes *CD36* e *Acadm* quando comparado com o grupo CF e FIBRA.

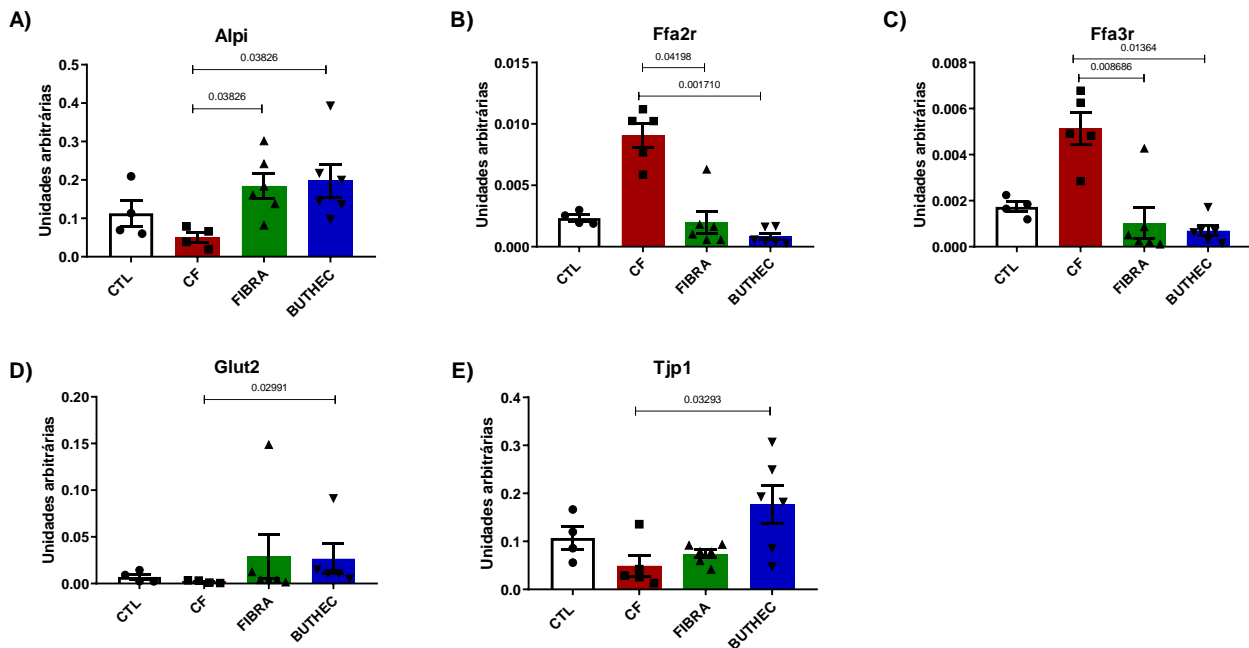


Figura 3. Alterações induzidas por Butirato e ou Fibras no mRNA de proteínas do células epiteliais do íleo. (A) *Alpi*, (B) *Ffa2r*, (C) *Ffa3r*, (D) *Glut-2*, (E) *Tjp1*. Média \pm desvio padrão e comparações estatísticas Kruskal-Wallis test (n=4-6 animais)

Discussão

A suplementação com butirato parece ter um efeito protetor em relação ao ganho de peso. Os animais do grupo suplementado com butirato consumiram mais dieta, mas paradoxalmente, foram os que menos ganharam peso. Além disso, esses animais apresentaram um peso semelhante ao do grupo controle. Este menor ganho de peso pode ser parcialmente explicado pela expressão de alguns genes. O gene *Alpi* (Alkaline Phosphatase, Intestinal) codifica a fosfatase alcalina intestinal, uma metaloenzima presente na borda em escova que hidrolisa o fosfato da fração lipídica A dos lipopolissacarídeos (LPS), componentes da membrana de bactérias gram-negativas. Dessa forma, reduz drasticamente a atividade agonista do receptor Toll-like 4². A atividade aumentada dessa enzima pode reduzir a inflamação ao neutralizar endotoxinas bacterianas, ajudando a manter a integridade da mucosa intestinal. A expressão de *Alpi* é induzida tanto pelo butirato quanto pela fibra, sugerindo que ambas as suplementações podem ter um efeito anti-inflamatório, embora isso não explique o ganho de peso no grupo FIBRA. O gene *Tjp2* (Tight Junction Protein 2) codifica a proteína ZO-2, essencial para as junções apertadas entre as células epiteliais intestinais, ajudando a manter a barreira intestinal. A integridade dessas junções é fundamental

para prevenir a permeabilidade intestinal aumentada, que pode levar à translocação de patógenos e moléculas pró-inflamatórias, resultando em inflamação³. A expressão de Tjp2 foi induzida somente pelo butirato, indicando um efeito redutor na permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, na inflamação. O gene Ffa2 (Receptor de Ácidos Graxos Livres 2) codifica o receptor de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) FFA2. A ativação de FFA2 pode ter efeitos anti-inflamatórios, modulando a resposta imune e promovendo a integridade da barreira intestinal. De maneira similar, o gene Ffa3 (Receptor de Ácidos Graxos Livres 3) também codifica um receptor de AGCC, principalmente propionato e butirato, e pode influenciar a motilidade intestinal, a secreção de hormônios intestinais e a resposta inflamatória, contribuindo para a homeostase intestinal⁴. Contudo, camundongos knockout intestinais específicos para o gene Ffa3, alimentados com uma dieta ocidental, foram amplamente protegidos da obesidade, exibindo níveis significativamente mais baixos de massa gorda, menor inflamação intestinal e expressão alterada dos hormônios incretinas intestinais⁵. Nossos resultados demonstraram uma menor expressão dos genes Ffa2r e Ffa3r nos grupos FIBRA e BUTHEC quando comparados ao grupo cafeteria, sugerindo um efeito compensatório para tentar captar mais AGCC dos intestinos, uma vez que a oferta seria menor. O menor ganho de peso do grupo BUTHEC pode ser explicado pela diminuição da expressão de Ffa3r, porém isso não justifica o ganho de peso observado no grupo FIBRA. O gene Glut2 (Transportador de Glicose 2) codifica um transportador de glicose e outros monossacarídeos, facilitando o transporte de glicose do lúmen intestinal para o sangue. A disfunção nesse transporte pode afetar o metabolismo energético das células intestinais e influenciar a resposta inflamatória⁶. Embora a expressão de Glut2 tenha sido induzida pelo butirato, será necessária uma análise histológica para determinar se a localização de Glut2 nas células epiteliais é apical ou basal. Se apical, Glut2 estaria retirando glicose da luz intestinal; se basal, estaria retirando glicose da circulação, contribuindo para o controle glicêmico. Em resumo, os camundongos alimentados com uma dieta de cafeteria suplementada com butirato foram amplamente protegidos contra a obesidade, exibindo níveis significativamente mais baixos de massa corpórea e uma expressão alterada de genes relacionados à inflamação e ao controle glicêmico. Embora nossos resultados ainda sejam preliminares, eles fornecem uma visão otimista sobre o mecanismo subjacente aos efeitos benéficos dos alimentos suplementados com ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Conseqüentemente, esses resultados podem orientar o desenvolvimento de alimentos funcionais para a prevenção de distúrbios metabólicos, como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e esteatose hepática não alcoólica (MASH).

Referência bibliográfica

- 1 Magro, D. O., Rossoni, C., Saad-Hossne, R. & Santos, A. INTERACTION BETWEEN FOOD PYRAMID AND GUT MICROBIOTA. A NEW NUTRITIONAL APPROACH. *Arq Gastroenterol* **60**, 132-136 (2023). <https://doi.org/10.1590/S0004-2803.202301000-15>
- 2 Parlato, M. *et al.* Human ALPI deficiency causes inflammatory bowel disease and highlights a key mechanism of gut homeostasis. *EMBO Mol Med* **10** (2018). <https://doi.org/10.15252/emmm.201708483>
- 3 Chelakkot, C., Ghim, J. & Ryu, S. H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* **50**, 1-9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>
- 4 Shimizu, H. *et al.* Dietary short-chain fatty acid intake improves the hepatic metabolic condition via FFAR3. *Sci Rep* **9**, 16574 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53242-x>
- 5 Lednovich, K. R. *et al.* Intestinal FFA3 mediates obesogenic effects in mice on a Western diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **323**, E290-E306 (2022). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00016.2022>
- 6 Tobar, N. *et al.* Metformin acts in the gut and induces gut-liver crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120**, e2211933120 (2023). <https://doi.org/10.1073/pnas.2211933120>