# Influência da colite induzida por DSS associada ao consumo de HFD sobre a barreira hematoencefálica e a inflamação hipotalâmica em camundongos C57BL/6

**Palavras-Chave: COLITE EXPERIMENTAL, BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA, DIETA HIPERLIPÍDICA**

**Autores(as):**
**CATARINA MICHELONE, FCA – UNICAMP**
**CAROLINE LOBO COSTA, FCA – UNICAMP**
**Prof(º). Dr(º). MARCIO ALBERTO TORSONI, FCA – UNICAMP**

## INTRODUÇÃO:

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), como a Retocolite Ulcerativa e a Doença de Crohn, apresentam alta morbidade e etiologia multifatorial. Estudos demonstram que fatores dietéticos, especialmente ao consumo de dietas ricas em gordura saturada e pobres em fibras favorecem a progressão dessas doenças (LEVINE et al., 2018). Esse padrão alimentar pode promover disbiose intestinal, aumento da permeabilidade epitelial e inflamação, sobretudo por reduzir a expressão de proteínas de junção (*tight junctions)* como ZO-1, ocludina e claudinas, bem como, de proteínas de adesão celular, como VE-Caderina, α-Catenina e β-catenina comprometendo a integridade da barreira intestinal (CANI et al., 2007; KADRY et al., 2020).

Tais alterações impactam o eixo microbiota-intestino-cérebro, um importante sistema de comunicação mediado por sinais metabólicos, neuroendócrinos e imunológicos entre o intestino e o sistema nervoso central (RHEE et al., 2009). Neste sentido, quando a barreira intestinal está comprometida, mediadores inflamatórios e metabólitos bacterianos podem atingir o cérebro e contribuir para a neuroinflamação.

Entre os mecanismos anti-inflamatórios envolvidos na regulação dessa resposta, destaca-se a ação do receptor colinérgico α7nAChR. Sua ativação por acetilcolina é capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias por meio da via JAK2-STAT3, exercendo um papel protetor frente à inflamação sistêmica e central (ROSAS-BALLINA et al., 2008). Contudo, a exposição a dietas hiperlipídicas e eventos inflamatórios reduz a expressão desse receptor no hipotálamo e em macrófagos, o que pode comprometer sua função reguladora (SOUZA et al., 2019; MARTINS et al., 2021).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da associação entre dieta hiperlipídica e colite experimental sobre a barreira hematoencefálica, a inflamação hipotalâmica e a expressão do receptor α7nAChR em camundongos C57BL/6.

## METODOLOGIA:

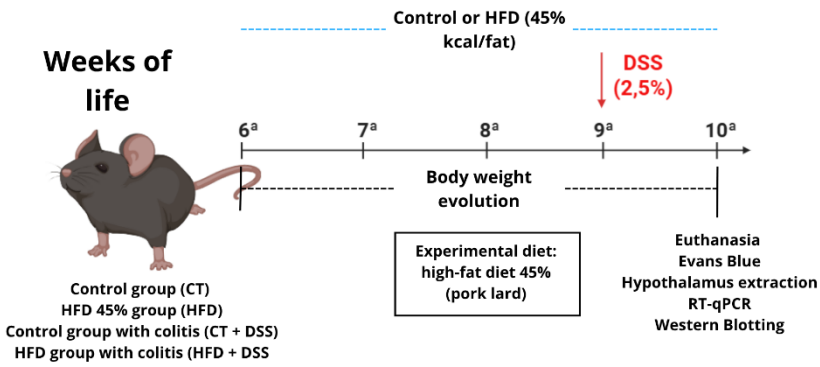



*Figura 1. Desenho experimental do presente estudo (Fonte: O autor, 2025).*

**Animais:** Foram utilizados animais machos com 6 semanas de vida da linhagem C57BL/6 (*Wild Type*) obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP) em estantes ventiladas, com temperatura da sala de 21±1ºC, ciclo claro/escuro de 12 horas e com água e ração ad libitum. Todos os procedimentos descritos neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP) sob protocolo de nº: 6342-1/2023 e 6623-1/2025. Os animais foram

| 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.

| Escala | Perda de Peso | Consistencia das Fezes | Presenca de Sangue nas Fezes |
|---|---|---|---|
| 0 | Não | Normal | Não |
| 1 | 1-5% | Normal | Não |
| 2 | 6-10% | Amolecidas | Sangramento leve |
| 3 | 11-20% | Amolecidas | Sangramento leve |
| 4 | >20% | Diarreia | Sangramento Intenso |

Tabela II. Sistema de Pontuação para Calcular o Índice de Atividade da Doença (IAD).

randomicamente distribuídos nos grupos experimentais (fig. 1).

**Dieta experimental:** a dieta ofertada aos animais por 4 semanas foi preparada no laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA). A quantidade dos nutrientes e o valor calórico foram ajustados a partir de uma dieta controle, visando aumentar a densidade calórica e o fornecimento de lipídios. Como produto final, foi obtida uma dieta hiperlipídica (45%) a partir da adição de fonte alimentar rica em gordura saturada (banha de porco). A tabela I mostra a composição da dieta hiperlipídica e a comparação com a dieta padrão.

**Indução da colite por DSS e avaliação da atividade da doença**: a colite experimental foi induzida pela administração de 2,5% de DSS (m.w.=36,000-50,000)(160110- MP Biomedicals) na água de beber por 7 dias. Durante o protocolo experimental da colite induzida pelo DSS os animais foram examinados diariamente em relação ao consumo alimentar e ao índice de atividade da doença, medido de acordo com escores referentes à perda de peso corporal, consistência fecal e sangue nas fezes. (GHIA, J. E., BLENNERHASSETT, P., e COLLINS, 2008; GHIA, J. E., GALEAZZI, F., FORD, D. C., HOGABOAM, C. M., VALLANCE, B. A., AND COLLINS, 2008).

**Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR**: para avaliar a quantia de transcrito de RNAm e inferência de estímulo para a expressão foi empregada a técnica de *real-time PCR* (qRT-PCR). A expressão relativa foi determinada usando os primers: CHRNA7, IL-6, TNFalfa, IL-1B e proteínas de permeabilidade Ocludina, Tjp1, Claudina 1 e 4, com o sistema de detecção TaqMan para os genes alvo, e os primers para proteínas de adesão celular Cdh5, Ctnna1 e Ctnnb1, com o sistema de detecção SYBR Green para os genes alvos. A qRT-PCR foi realizada na plataforma ABI Prism 7500. Os dados foram analisados usando o Sistema de Detecção de Sequência 1.7 (Applied Biosystems).

**Expressão proteica por Western blotting:** o conteúdo proteico obtido do processamento do hipotálamo foi dosado através do método de *BCA protein assay kit* (23225; *Thermo Fisher Scientific*) e posteriormente diluídos em tampão de Laemmli. As amostras diluídas foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). Proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose e os resultados serão avaliados através do blotting com os seguintes anticorpos específicos: Ocludina, ZO-1 e α-Catenina. O sinal foi detectado por quimioluminescência com kit ECL da Amersham em sistema de detecção automatizado.

**Análises estatísticas:** para análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 9.0 (La Jolla, CA), onde foram realizados os testes de hipótese e confecção de gráficos. Os dados foram avaliados quanto à normalidade através do teste de ShapiroWilk. Dados de distribuição normal foram expressos em média ± erro padrão da média (E.P.M.), enquanto aqueles cuja distribuição não foi normal foram expressos em mediana (percentis 25-75). Os dados paramétricos foram analisados através de teste T de student não pareado ou ANOVA ONE-way seguido pós-teste de Bonferroni, de acordo com os grupos e fatores incidentes. Os dados considerados não paramétricos foram analisados através dos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. O nível de significância estatística será mantido em 5% ($p<0,05$).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

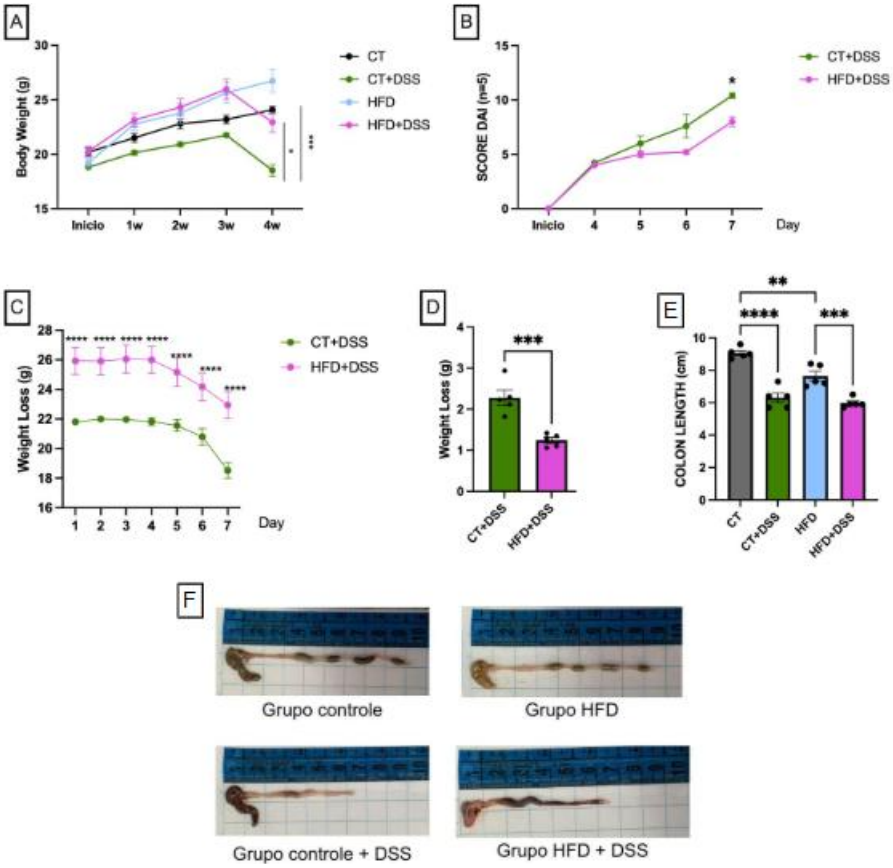
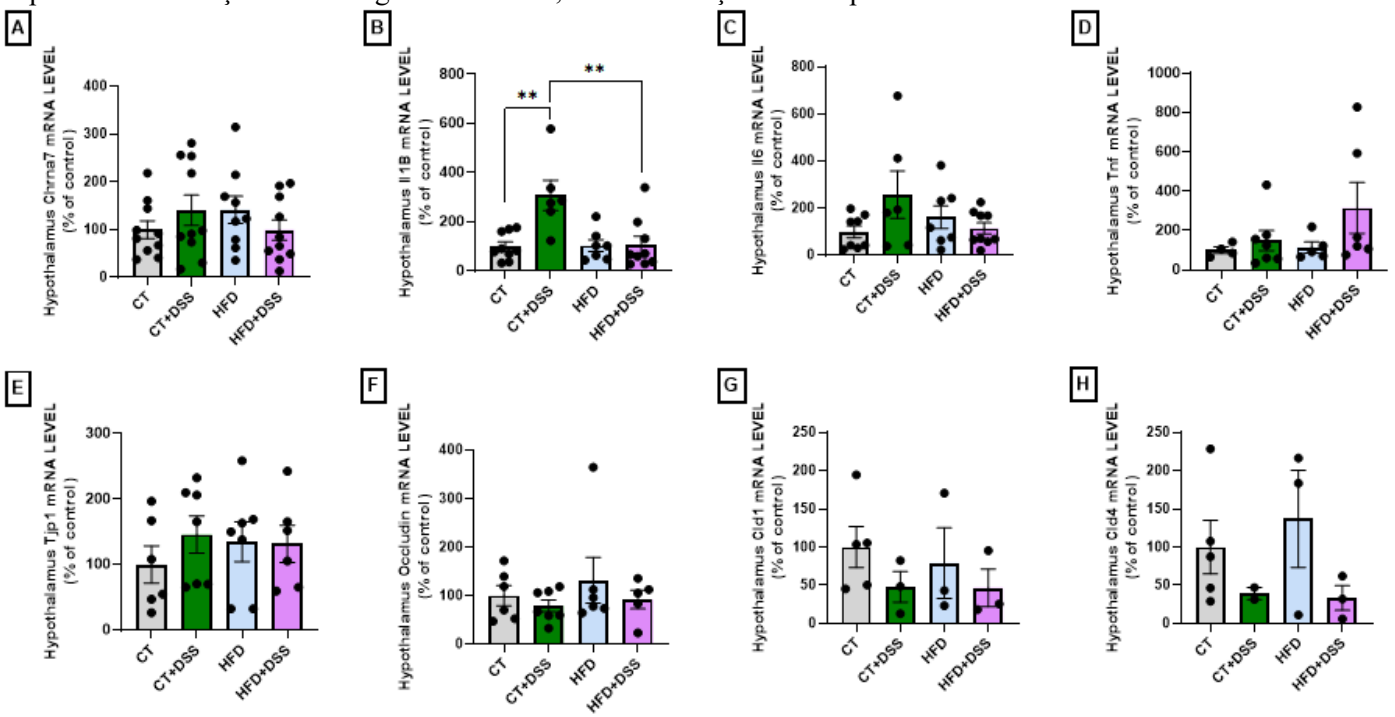



Figura 1. Avaliação do peso corporal, score da doença, perda de peso e comprimento do cólon. N=5/grupo. *One-way* ANOVA, *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Para avaliar o escore da colite, foram monitorados o sangramento retal, a consistência das fezes, a perda de peso e, após a eutanásia, o comprimento do cólon. Observou-se que os animais do grupo CT+DSS apresentaram uma perda de peso mais acentuada em comparação aos grupos CT e HFD+DSS (Fig. 1A). Em relação ao Índice de Atividade da Doença, o grupo CT+DSS também apresentou escore maior em comparação ao grupo HFD+DSS (Fig. 1B). Ao longo dos sete dias de indução da colite, o grupo HFD apresentou ganho de peso até o 4º dia, iniciando a perda posteriormente, enquanto o grupo controle iniciou a perda de peso um dia antes (Fig. 1C). Essa diferença foi mais acentuada no grupo CT+DSS do que no grupo HFD+DSS (Fig. 1D). Esses achados contrastam com estudos anteriores, como o de Papoutsis et al. (2022), que demonstraram efeitos deletérios da HFD em modelos de colite experimental. No estudo citado, camundongos foram submetidos a uma HFD por 15 semanas, enquanto no presente estudo o protocolo experimental foi mais curto (4 semanas), utilizando uma HFD com 45% de lipídios. Apesar da divergência com a literatura, a menor perda de peso observada no grupo HFD+DSS pode estar relacionada ao aumento da massa de gordura corpórea promovido pela HFD.

Por outro lado, o comprimento do cólon foi significativamente reduzido nos grupos CT+DSS e HFD em comparação ao grupo CT, e ainda menor no grupo HFD+DSS em relação ao grupo HFD (Fig. 1E e F). Esses resultados indicam que, embora a HFD tenha resultado em menor escore de atividade da doença e menor perda de peso, ela por si só promoveu alterações morfológicas deletérias, como a redução no comprimento do cólon.



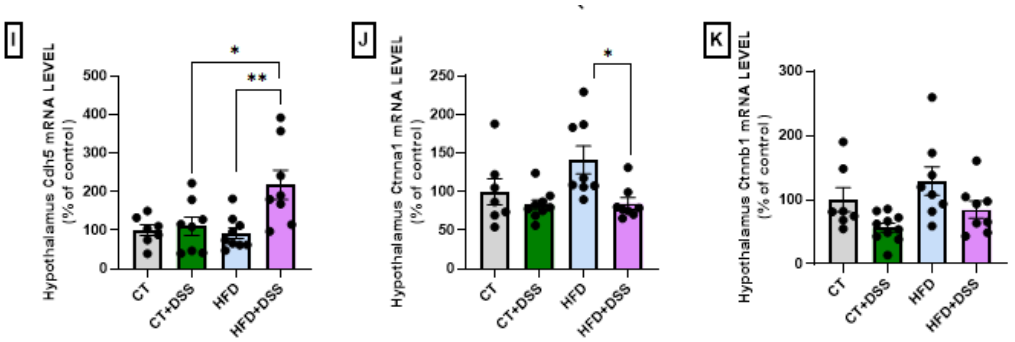



**Figura 2.** Expressão gênica de (A) nível de mRNA (qRT-PCR) de Chrna7 do hipotálamo, expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias (B nível de mRNA (qRT-PCR) de Il1B do hipotálamo, (C) nível de mRNA (qRT-PCR) de IL6 do hipotálamo, (D) nível de mRNA (qRT-PCR) de TNF do hipotálamo, expressão gênica das proteínas de junção (E) nível de mRNA (qRT-PCR) de Tjp1 do hipotálamo, (F) nível de mRNA (qRT-PCR) de Ocludina hipotálamo, (G) nível de mRNA (qRT-PCR) de Claudina 1 do hipotálamo, (H) nível de mRNA (qRT-PCR) de Claudina 4 do hipotálamo, expressão gênica das proteínas de adesão celular (I) nível de mRNA (qRT-PCR) de Cdh5 do hipotálamo, (J) nível de mRNA (qRT-PCR) de Ctnna1 do hipotálamo, (K) nível de mRNA (qRT-PCR) de Ctnnb1 do hipotálamo. O GAPDH foi usado como controle endógeno em A, B, C, D, E, F, G, H e o ACTB foi usado como controle endógeno em I, J e K. Resultados apresentados em média ± E.P.M. ANOVA, *$p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.

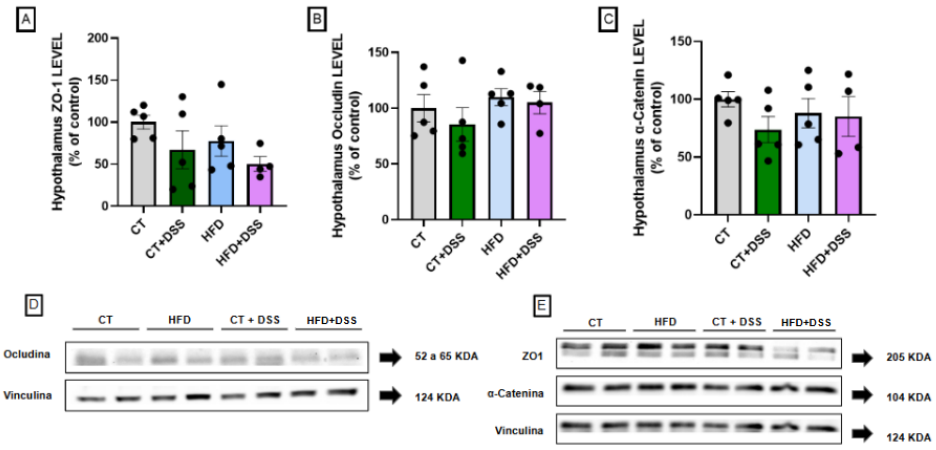
Para investigar se a colite associada ao consumo de HFD impactam na expressão hipotalâmica do receptor α7nAChR, dada a importância desse receptor no processo inflamatório, analisou-se sua expressão gênica (fig. 2 A), mas não houve diferença entre os grupos.

Estudos têm demonstrado que o consumo de HFD promove aumento da permeabilidade e inflamação da BHE, o que afeta funções hipocampais e hipotalâmicas (DE AQUINO et al., 2019). Isso ocorre devido ao desenvolvimento de um estado crônico de inflamação de baixo grau que contribui para neuroinflamação (LAMA et al., 2022). Porém, ao avaliar a expressão gênica da citocina inflamatória IL-1B, observou-se menor expressão no grupo HFD+DSS em relação ao CT+DSS (fig. 2 B), o que diverge da literatura. Com relação às citocinas IL-6 e TNF-α não foram encontradas diferenças significativas (fig. 2 C e D). Estudos prévios comprovam a existência de neuroinflamação associada às DIIs, visto que, mediadores inflamatórios vindos do intestino penetram na BHE e ativam macrófagos residentes no sistema nervoso central (CRAIG, et al., 2022). Neste sentido, observou-se maior expressão gênica de IL-1B no CT+DSS em relação ao CT (fig. 2 B), o que vai ao encontro da literatura.

O aumento de mediadores inflamatórios pode levar à disfunção da BHE, reduzindo a expressão de proteínas de junção (*Tigh junctions*) e aumentando a permeabilidade (BANKS, 2005). Portanto, avaliou-se a expressão gênica das proteínas de junção ZO-1 (fig. 2 E), Ocludina (fig. 2 F), Claudina 1 (fig. 2 G), Claudina 4 (fig. 2 H), envolvidas na permeabilidade paracelular. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Avaliou-se, então, a expressão gênica proteínas de adesão celular Cdh5 (VE-caderina) (fig. 2 I), Ctnna1 (α-catenina) (fig. 2 J) e Ctnnb1 (β-catenina) (fig. 2 K), uma vez que a literatura tem demonstrado seu importante papel como componentes centrais das junções de adesão (AJs), estruturas fundamentais para a manutenção da integridade da barreira endotelial. No presente estudo, observou-se maior expressão gênica de VE-caderina no grupo HFD-DSS com relação aos grupos CT+DSS e HFD (fig. 2 I). No contexto da neuroinflamação, essa proteína pode ser internalizada, sendo retirada da membrana e direcionada ao interior da célula, desse modo, as junções são desorganizadas, enfraquecendo a adesão entre células e aumentando a permeabilidade (LI, et al., 2018). Assim, no presente estudo, a maior expressão de VE-caderina observada no grupo HFD+DSS em comparação ao grupo CT+DSS coincide com a menor expressão gênica de IL1B (fig. 2B), sugerindo uma possível associação entre a menor presença dessa citocina pró-inflamatória e a preservação da integridade endotelial. Contudo, essa relação só foi observada quando há associação da HFD com a colite, não se alterando quando administrada a dieta ou a doença isoladamente. Adicionalmente, um estudo de Langer et al., 2019, indica que o aumento da expressão de VE-caderina pode estar relacionado à intensificação da angiogênese, que, em contexto inflamatório intestinal, é desorganizada e patológica, contribuindo para a perpetuação da inflamação e disfunção da barreira vascular (LANGER et al., 2019).

Ademais, observou-se menor expressão gênica de α-catenina no grupo HFD-DSS com relação ao grupo HFD (fig. 2 J), o que pode culminar em alterações na permeabilidade da BHE, dado que a α-Catenina se encontra amplamente distribuída na barreira hematoencefálica e exerce um importante papel na permeabilidade celular, uma vez que ligam as proteínas de membrana caderinas ao citoesqueleto de actina, formando junções aderentes entre as células (KADRY et al., 2020). Não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica de β-catenina (fig. 2 K).




Também foram avaliados os níveis de Ocludina e ZO-1 e α-Catenina no hipotálamo através do Western Blotting, mas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (fig.3).

**Figura 3.** Níveis das proteínas de junção. (A) nível de ZO- do cólon e (B) nível de Ocludina do hipotálamo. Nível da proteína de adesão (C) nível de α-Catenina do hipotálamo e (D e E) Imagem representativa das bandas de *Western Blot*. N=5/grupo. *One-way* ANOVA, *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

## CONCLUSÕES:

Em conclusão, os achados do presente estudo corroboram com a efetividade do DSS na indução da colite experimental. Além disso, demonstram que a HFD exerce alterações estruturais deletérias e um encurtamento do comprimento no cólon, reforçando sua influência negativa sobre a integridade intestinal. No contexto da neuroinflamação associada à colite, o aumento de IL1B no hipotálamo dos animais com dieta controle indica uma resposta inflamatória central modulada pela inflamação periférica. Já a menor expressão gênica de IL-1β no grupo HFD acompanha o aumento da expressão de VE-caderina, proteína envolvida na integridade da BHE, o que pode estar relacionado a mecanismo compensatório ou a um processo angiogênico patológico. Em contrapartida, a redução da expressão de α-catenina pode indicar comprometimento da adesão celular e maior permeabilidade. Assim, embora não tenha sido encontrado um quadro inflamatório hipotalâmico relacionando a HFD na colite, os efeitos da HFD sobre a estrutura e função da barreira hematoencefálica demandam atenção e mais estudos.

## BIBLIOGRAFIA


BANKS, W. A. **Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology**. Current Pharmaceutical Design, v. 11, n. 8, p. 973–984, 2005.

CANI, P. D. et al**. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance**. Diabetes, v. 56, jul. 2007, p. 1761–1772.

CRAIG, C. F. et al. **Neuroinflammation as an etiological trigger for depression comorbid with inflammatory bowel disease**. Journal of Neuroinflammation, v. 19, n. 1, p. 4, 2022.

DE AQUINO, C. C. et al. **Effect of Hypoproteic and High-Fat Diets on Hippocampal Blood-Brain Barrier Permeability and Oxidative Stress**. Frontiers in Nutrition, v. 5, p. 131, 2019.

KADRY, et al. **A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity**. Fluids and Barriers of the CNS, v. 17, p. 69, 2020.

LAMA, A. et al. **Palmitoylethanolamide dampens neuroinflammation and anxiety-like behavior in obese mice**. Brain, Behavior, and Immunity, v. 102, p. 110–123, 2022.

LEVINE, A. et al. **Evolving role of diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases**. Gut, v. 67, n. 9, p. 1726–1738, 2018.

LI, W. et al. **The Role of VE-cadherin in Blood-brain Barrier Integrity Under Central Nervous System Pathological Conditions**. Current Neuropharmacology, v. 16, n. 9, p. 1375–1384, 2018.

PAPOUTSIS, D. et al. **A High-Fat Western Diet Attenuates Intestinal Changes in Mice with DSS-Induced Low-Grade Inflammation**. The Journal of Nutrition, v. 152, n. 3, p. 758–769, 2022.

RHEE, S. H. et al. **Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis**. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, v. 6, n. 5, p. 306–314, 2009.

ROSAS-BALLINA, M. et al. **Splenic nerve is required for cholinergic anti-inflammatory pathway control of TNF in endotoxemia**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 31, p. 11008–11013, 2008.

SOUZA, A. C. P. et al. **Short-term high-fat diet consumption reduces hypothalamic expression of the nicotinic acetylcholine receptor α7 subunit (α7nAChR) and affects the anti-inflammatory response in a mouse model of sepsis**. Frontiers in Immunology, v. 10, n. March, p. 1–15, 2019.

LANGER, V. et al. **IFN-γ drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VE-cadherin-directed vascular barrier disruption**. The Journal of Clinical Investigation, v. 129, n. 11, p. 4691–4707, 2019.