

Impacto do consumo de dieta hiperlipídica (HFD) associado a inflamação do cólon na expressão do miR-122 hepático de camundongos

Palavras-Chave: Colite Ulcerativa, miR-122, dieta hiperlipídica (HFD), Doença Hepática Gordurosa associada à Disfunção Metabólica (DHGDM)

Autores(as):

Luize Naomi Machado Utino, 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 (RCU) e a Doença de Crohn (DC), tem alta prevalência e morbidade na população. Sendo relacionadas, com fatores genéticos e ambientais dos indivíduos portadores (SEYEDIAN; NOKHOSTIN; DARGAHI MALAMIR, 2019). Entre um dos fatores ambientais, está a dieta, que em elevados níveis de gordura, pode levar ao aumento da permeabilidade intestinal e a presença de citocinas pró inflamatórias na corrente sanguínea. Assim, a dieta hiperlipídica (HFD) influencia no agravamento das DII, contribuindo com o aumento da inflamação do trato gastrointestinal (TGI), através da absorção de lipopolissacarídeo (LPS) no plasma sanguíneo (FRAZIER; DIBASE; MCCLAIN, 2011). Além disso, a literatura demonstra que essas vias inflamatórias inibem o HNF4 alfa (Fator nuclear de hepatócitos 4 alfas), fator transcricional do gene miR-122 no fígado (LI et al., 2021). Nesse sentido, o estudo propõe investigar quais os efeitos que a Retocolite ulcerativa (RU) junto a HFD, tem na expressão do miR-122 no fígado de camundongos.

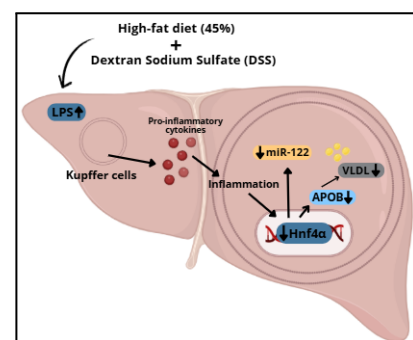


Figura 1. Representação esquemática da hipótese do presente estudo. (Fonte: O autor, 2025)

Metodologia:

1. Animais e dieta experimental:

Foram utilizados animais machos com 6 semanas de vida da linhagem C57BL/6 (Wild Type), distribuídos randomicamente nos grupos de acordo com a manipulação dietética e presença da doença .

Os animais receberam dieta padrão para roedores ou dieta hiperlipídica (HFD-45%) a partir da adição de fonte alimentar rica em gordura saturada (banha de porco) durante 4 semanas.

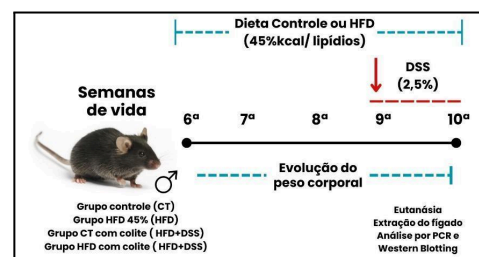


Figura 2. Desenho experimental do presente estudo (Fonte: O autor, 2024).

2. Indução da colite por DSS e avaliação da atividade da doença:

A colite experimental foi induzida pela administração de 2,5% de DSS na água de beber por 7 dias. Durante o

protocolo experimental da colite, os animais foram examinados diariamente em relação ao consumo alimentar e ao índice de atividade da doença (IAD), medido com escores referentes à perda de peso corporal, consistência fecal e sangue nas fezes (GHIA, J. E., BLENNERHASSETT, P., AND COLLINS, 2008)

Escala	Perda de Peso	Consistência das Fezes	Presença 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

O valor do IAD foi calculado através da soma da pontuação para perda de peso, consistência das fezes e a presença de sangue nas fezes. IAD: Índice de Atividade da Doença.

Tabela 1. Sistema de Pontuação para Calcular o índice de Atividade da Doença (IAD).

3. Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

Para avaliação da quantidade de transcrito de mRNA e inferência de estímulo para a expressão foi realizado o real-time PCR (qRT-PCR). A expressão relativa foi determinada utilizando os primers para: TNF alfa, IL-1B, IL-10, SIRT1, AGPAT1, PTP1B, CPEB1, PPARG, miR-122 e HNF4a com o sistema de detecção TaqMan e SYBER para os genes alvo.

4. Expressão proteica por Western blotting:

O conteúdo protéico obtido do processamento do fígado foi avaliado através do blotting com os seguintes anticorpos específicos: SIRT1, AGPAT1 e PTP1B. O sinal foi detectado por quimioluminescência com kit ECL da Amersham em sistema de detecção automatizado.

Resultados e discussão:

1. Tratamento com DSS:

O peso corporal dos animais apresentou alterações ao longo do tratamento. Independentemente da dieta, a administração de DSS resultou em redução de peso, sendo mais acentuada no grupo CT+DSS em comparação aos grupos HFD+DSS e CT (Fig. 3A).

Essa perda já era esperada, pois é uma característica associada ao tratamento com DSS (Chassaing et al., 2014; Li et al., 2021). Da mesma forma, a menor perda de peso no grupo HFD+DSS também era prevista, devido à composição da dieta e resultados prévios, como o de Li et al. (2019), que demonstrou aumento de peso em camundongos com dieta 60% gordura e colite induzida por TNBS.

No Índice de Atividade da Doença (DAI), o grupo CT+DSS teve pontuação superior ao grupo HFD+DSS (Fig. 3B), indicando maior agravamento. Ao comparar a perda de peso durante os 7 dias de DSS e a perda final, o grupo CT também apresentou maior perda que o grupo HFD (Fig. 3C e D).

Essa pontuação maior do grupo CT no DAI não indica efeito benéfico da dieta, pois um dos critérios avaliados é a perda de peso, que foi menor no grupo HFD+DSS. Além disso, Cheng et al. (2016) observaram que camundongos tratados com DSS e dieta 60% gordura por 6 a 8 semanas apresentaram DAI mais alto, sugerindo que quantidade e duração da dieta hiperlipídica podem agravar a colite.

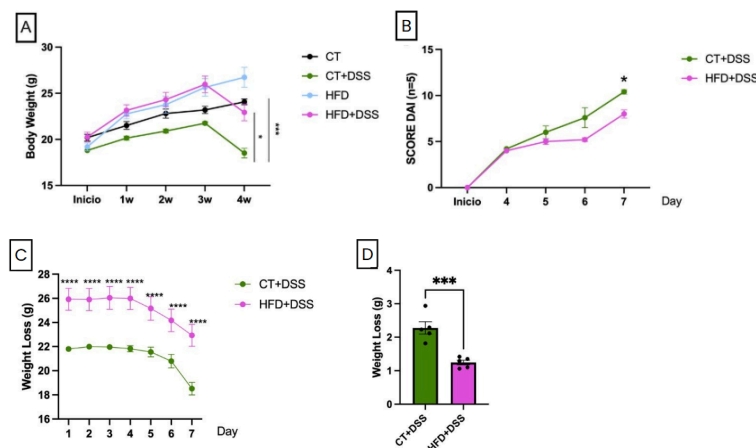


Figura 3: (A) Peso dos animais durante as 4 semanas, (B) índice de atividade da doença (C) perda de peso durante os 7 dias da administração do DSS (D) perda de peso final dos grupos com DSS

2. Expressão gênica por RT-qPCR;

Sobre a expressão gênica do miR-122 no fígado dos animais, os grupos com DSS, independente da dieta, apresentaram menor expressão quando comparados ao grupo HFD (Fig. 4 A).

Essa diminuição nos grupos com DSS, pode estar associada ao processo inflamatório da doença. Já que, o aumento da permeabilidade intestinal nas DII, eleva os níveis de lipopolissacarídeos (LPS) na corrente sanguínea e propicia a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células de kupffer no fígado. Esse mecanismo inibe a expressão do HNF4 alfa nos hepatócitos, fator transcricional do miR-122, que assim teria sua expressão diminuída. (LI et al., 2021; LU et al., 2022).

Com relação à expressão gênica de citocinas no fígado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de IL-1 β e IL-10 entre os grupos (Fig. 5A e 5C). No entanto, o grupo CT+DSS apresentou um aumento significativo na expressão de TNF- α em comparação ao grupo CT, assim como o grupo HFD em relação ao grupo HFD+DSS (Fig. 5B).

Os resultados obtidos para IL-1 β e IL-10 ainda devem ser interpretados com cautela, uma vez que o número amostral atual pode não ser suficiente para mostrar possíveis diferenças sutis. Visto que, a literatura, como demonstrado por LI et al. (2021), aponta um aumento na expressão hepática de IL-1 β em modelos com DSS, e portanto seria esperado nas condições experimentais testadas.

Em relação à TNF- α , os resultados obtidos corroboram parcialmente com os dados descritos por LI e colaboradores, que observaram aumento da expressão dessa citocina em grupos expostos ao DSS em diferentes concentrações (1%, 2% e 3%). No entanto, o achado de maior expressão no grupo HFD em comparação ao grupo HFD+DSS ainda não foi descrito na literatura, o que indica a necessidade de novos estudos para elucidar os mecanismos envolvidos nessa resposta.

Com relação à expressão gênica de genes relacionados com metabolismo hepático não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de Agpat1, Ptpn1, Cpeb1 e Sirt1 entre os grupos (Fig. 6A, 6B, 6C, 6E). No entanto, o grupo CT+DSS apresentou redução significativa na expressão de Pparg em relação ao grupo CT, assim como o grupo HFD+DSS em relação ao grupo HFD (Fig. 6D).

Os resultados obtidos para Agpat1, Ptpn1, Cpeb1 e Sirt1 ainda devem ser interpretados com cautela, uma vez que o número amostral atual pode não ser suficiente para mostrar possíveis diferenças sutis. Visto que, na literatura,

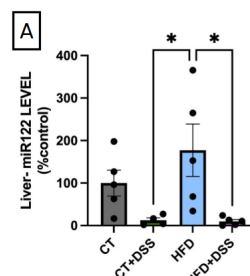


Figura 4: Expressão gênica do miR-122 (A) microRNA level (qRT-PCR) de miR-122 o fígado. O U6 foi usado como endógeno. Resultados apresentados em média $\pm$ E.P.M. ANOVA, *p < 0.05 e ** p < 0.01.

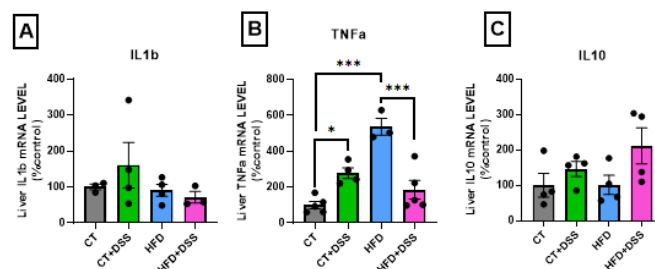


Figura 5: Expressão gênica de IL1b, TNFa e IL10. (A) mRNA level (qRT-PCR) de IL1b do fígado, (B) mRNA level (qRT-PCR) de TNFa do fígado, (C) mRNA level (qRT-PCR) de IL10 do fígado. O GAPDH (IL1b) e o 18S (TNFa e IL10) foram usados como endógenos. Resultados apresentados em média $\pm$ E.P.M. ANOVA, *p < 0.05 e ** p < 0.01.

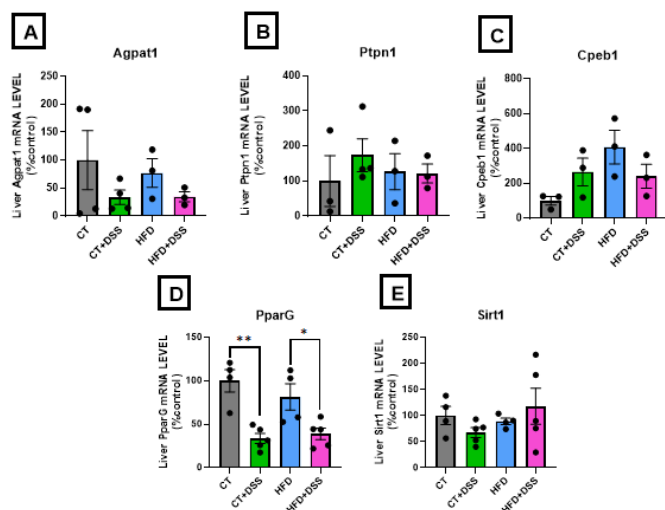


Figura 6: Expressão gênica de Agpat1, Ptpn1, Cpeb1, Pparg e Sirt1. (A) mRNA level (qRT-PCR) de Agpat1 do fígado, (B) mRNA level (qRT-PCR) de Ptpn1 do fígado, (C) mRNA level (qRT-PCR) de Cpeb1 do fígado, (D) mRNA level (qRT-PCR) de Pparg do fígado, (E) mRNA level (qRT-PCR) de Sirt1 do fígado. O GAPDH (Agpat1 e Ptpn1) e o 18S (Cpeb1, Pparg e Sirt1) foram usados como endógenos. Resultados apresentados em média $\pm$ E.P.M. ANOVA, *p < 0.05 e ** p < 0.01.

PTPN1 tem superexpressão em casos de Doença Hepática Gordurosa associada à Disfunção Metabólica (DOMINIKA KOŁODZIEJ-SOBCZAK; SOBCZAK; ŁĄCZKOWSKI, 2024), AGPAT1 tem regulação positiva quando miR-122 está diminuído, propiciando a síntese de lipídios no fígado (WEN; FRIEDMAN, 2012), Cpeb1 tem controle negativo exercido por miR-122, com implicações para metabolismo lipídico, inflamação e autofagia (JIN et al., 2020) e Sirt1, um regulador metabólico, tem expressão diminuída aos camundongos serem expostos ao DSS (LI et al., 2021).

De forma consistente com a literatura, a diminuição da expressão de Ppar γ observada nos animais expostos ao DSS era um resultado esperado. Já que, no estudo conduzido por LI e colaboradores, camundongos que foram tratados com diferentes concentrações de DSS (1%, 2% e 3%), apresentaram redução significativa na expressão de Ppar γ hepático, corroborando com os achados do presente experimento.

Com relação à expressão gênica de genes relacionados ao metabolismo e secreção de VLDL, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de Hnf4a e ApoB entre os grupos experimentais (Fig. 7A e 7B). Entretanto, esses resultados devem ser interpretados com cautela, pois o número amostral reduzido pode ter limitado a detecção de resultados sutis.

Além disso, a literatura já demonstrou que modelos experimentais com DSS e dietas ricas em gordura (HFD) podem promover alterações no metabolismo lipídico hepático, em especial por meio da redução da expressão de Hnf4a e ApoB nos hepatócitos. Essa inibição compromete a montagem e secreção de VLDL, dificultando o transporte de triglicerídeos do fígado para outros tecidos (Li et al., 2021; Lu et al., 2022).

3. Expressão proteica por Western blotting:

Sobre a expressão proteica de Sirt1 no fígado dos animais, o grupo CT+DSS apresentou aumento significativo em relação ao grupo CT, assim como o grupo HFD+DSS em relação ao grupo HFD (Fig. 7A). Já Agpat1, teve aumento estatístico no grupo HFD+DSS em relação ao grupo HFD (Fig. 8 B).

Os resultados obtidos de Sirt1 não estavam de acordo com o esperado. Esse gene, que atua como um importante regulador metabólico, costuma apresentar redução na expressão gênica em modelos animais expostos ao DSS, conforme descrito na literatura (LI et al., 2021).

Assim, seria esperado que a expressão proteica de SIRT1 também estivesse diminuída nos grupos com colite, uma vez que a inflamação intestinal tende a suprimir sua atividade no fígado.

Portanto, essa diferença observada entre os dados experimentais e a tendência descrita, reforça a necessidade de

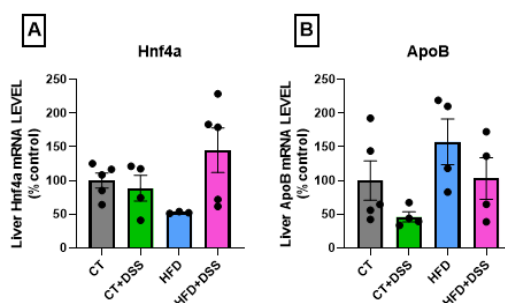


Figura 7: Expressão gênica de HNF4a e ApoB. (A) mRNA level (qRT-PCR) de HNF4a do fígado, (B) mRNA level (qRT-PCR) de ApoB do fígado. O 18S foi usado como endógeno. Resultados apresentados em média $\pm$ E.P.M. ANOVA, * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.

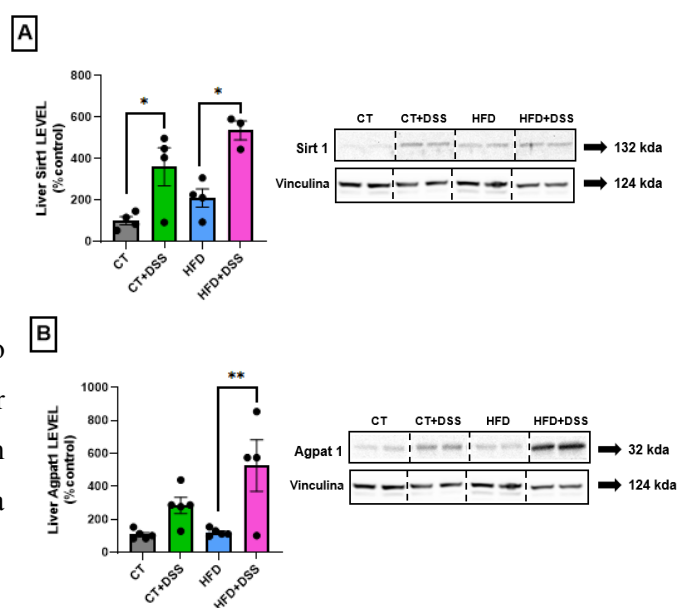


Figura 8: Níveis das proteínas Sirt1 e Agpat1. (A) Sirt1 level do fígado, (B) Agpat1 level do fígado. A vinculina foi usado como endógeno. Resultados em média $\pm$ E.P.M. ANOVA, * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.

aumentar o número amostral e considerar mecanismos compensatórios ou temporais que influenciam a regulação de SIRT1 (LI et al., 2021).

Por outro lado, o resultado observado para *Agpat1* (Fig. 8B) era esperado, considerando que seu RNAm é alvo do de miR-122 que está reduzido nos animais tratados com DSS (Fig. 4A), indicando que pode estar havendo o estímulo à síntese lipídica hepática (WEN; FRIEDMAN, 2012).

Conclusão:

Assim, os resultados deste estudo indicam que a colite induzida por DSS, isoladamente ou associada à HFD, afeta a homeostase hepática, possivelmente pela modulação da expressão do miR-122. A redução de miR-122 nos grupos com colite sugere que a possível condição inflamatória sistêmica promove redução da expressão hepática de *Hnf4α*, como foi visto pela literatura (LI et al., 2021). Essa supressão pode contribuir para alterações no metabolismo lipídico, como evidenciado pelo aumento proteico de *Agpat1* e variações na expressão de genes relacionados à lipogênese. Além disso, embora não tenham sido encontradas diferenças significativas em vários genes analisados, os dados apontam tendências consistentes com a literatura, mostrando um potencial envolvimento de miR-122 na regulação de *Ppary*, *Sirt1* e outros alvos em contextos inflamatórios hepáticos. Logo, o presente trabalho contribui para o entendimento entre dieta hiperlipídica e doença inflamatória intestinal no contexto hepático, através da expressão de miR-122.

Bibliografia:

- 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.
- LI, P. et al. Gut inflammation exacerbates high-fat diet induced steatosis by suppressing VLDL-TG secretion through HNF4α pathway. *Free radical biology & medicine*, v. 172, p. 459–469, 1 ago. 2021.
- LI, Z.-Y. et al. Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4α. *Journal of Hepatology*, v. 55, n. 3, p. 602–611, 1 set. 2011.
- SEYEDIAN, S.; NOKHOSTIN, F.; DARGAHI MALAMIR, M. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *Journal of Medicine and Life*, v. 12, n. 2, p. 113–122, 2019.
- CHASSAING, B. et al. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Current Protocols in Immunology*, p. 15.25.1–15.25.14, 4 fev. 2014.
- KWON, J. et al. DSS-induced colitis is associated with adipose tissue dysfunction and disrupted hepatic lipid metabolism leading to hepatosteatosis and dyslipidemia in mice. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, 5 mar. 2021.
- CHENG, L. et al. High fat diet exacerbates dextran sulfate sodium induced colitis through disturbing mucosal dendritic cell homeostasis. *International Immunopharmacology*, v. 40, p. 1–10, nov. 2016.
- JIN, X. et al. Antagonizing circRNA_002581-miR-122-CPEB1 axis alleviates NASH through restoring PTEN-AMPK-mTOR pathway regulated autophagy. *Cell Death & Disease*, v. 11, n. 2, p. 123, 13 fev. 2020.
- LU, H. et al. Crosstalk of hepatocyte nuclear factor 4a and glucocorticoid receptor in the regulation of lipid metabolism in mice fed a high-fat-high-sugar diet. *Lipids in Health and Disease*, v. 21, n. 1, 25 maio 2022.
- LI, X. et al. High-fat diet promotes experimental colitis by inducing oxidative stress in the colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 317, n. 4, p. G453–G462, 1 out. 2019.
- DOMINIKA KOŁODZIEJ-SOBCZAK; SOBCZAK, L.; ŁĄCZKOWSKI, K. Z. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): A Comprehensive Review of Its Role in Pathogenesis of Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 13, p. 7033–7033, 27 jun. 2024.
- WEN, J.; FRIEDMAN, J. R. miR-122 regulates hepatic lipid metabolism and tumor suppression. *Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 8, p. 2773–2776, 1 ago. 2012.
- LONG, J.-K. et al. miR-122 promotes hepatic lipogenesis via inhibiting the LKB1/AMPK pathway by targeting *Sirt1* in non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular Medicine*, v. 25, n. 1, 13 jun. 2019.