



Participação do receptor muscarínico do tipo M1 na proteção e prevenção de desenvolvimento de sepse e sobrevida de proles de mães obesas.

Autores: Inês, G. C.¹; Costa, S. O.¹; Lopes, P. K. F.¹; Ignacio-Souza, L. M.¹; Milanski, M.¹; Torsoni, A. S.¹; Torsoni, M. A.¹

¹ Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo-SP.

1. Introdução

Na atualidade é crescente o número de mecanismos epigenéticos ativados por fatores ambientais durante a gravidez que promovem mudanças na expressão gênica e alteram o desenvolvimento da prole (Desai, Jellyman e Ross, 2015). Whitaker e colaboradores verificaram que o excesso de peso materno durante a gestação e lactação dobra o risco de desenvolvimento da obesidade na vida adulta, independentemente do estado nutricional durante a infância precoce (Whitaker *et al.*, 1997).

O LPS, maior componente da parede das bactérias gram-negativas, é amplamente estudado como principal mediador da patogênese da infecção bacteriana (Ramachandran, 2014) podendo levar a sepse, que é caracterizada como uma resposta imune sistêmica a uma infecção causada por bactérias, vírus, fungos ou protozoários levando a disfunção orgânica (Esposito *et al.*, 2017).

Junto com nutrientes provenientes da dieta, como ácidos graxos saturados, o LPS pode promover a expressão e liberação de citocinas por meio das vias mediadas pelos TLR (Toll-like receptors) que ativam as proteínas quinases JNK (c-jun N-terminal kinase), IKK (inhibitor of kinase) e PKR (protein kinase R) (Solinas e Karin, 2010).

Para regular a resposta inflamatória uma cascata de sinalização mediada pelo nervo vago é ativada e faz a comunicação entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune (Blalock, 2002; Tracey, 2002). Esta via é denominada “reflexo anti-inflamatório colinérgico” e constituída pela via aferente de sinalização do nervo vago, que é ativada por citocinas e patógenos, e a via eferente de sinalização do nervo vago que controla a intensidade da resposta inflamatória através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (Pavlov e Tracey, 2012; Tracey, 2009). Estudos mostram que a inibição do reflexo anti-inflamatório resulta em uma resposta inflamatória exacerbada (Andersson e Tracey, 2012; Pavlov *et al.*, 2003).

Diferentes mecanismos relacionados a ativação de vias inflamatórias têm sido observado na prole e associado ao consumo materno de HFD durante a gestação e lactação: ativação de proteínas relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático vias pró-inflamatórias no hipotálamo e tecido hepático (Melo *et al.*, 2014), modulação do metabolismo hepático de lipídios

(Benatti *et al.*, 2014) e sinalização da insulina (Ashino *et al.*, 2012) na fase adulta e redução da expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ (Payolla *et al.*, 2016).

Em investigações prévias observamos que a expressão do receptor muscarínico m1 no SNC das proles de mães obesas e os níveis de mRNA são maiores comparado à prole de mãe que recebeu dieta controle. Ao realizar o teste de sobrevivência por injeção de LPS a prole de mães obesa apresentou menor taxa de mortalidade comparada a prole de mãe controle. Assim, nós hipotetizamos que o consumo materno de dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação modula positivamente a expressão do receptor m1AChR e confere menor taxa de mortalidade em quadro de sepse.

2. Métodos

Para a realização do projeto foram utilizados camundongos *Mus musculus* (fêmeas) da linhagem Swiss cedidos da colônia CEMIB-UNICAMP, com aproximadamente 6 semanas de idade. Tais animais foram separados em dois grupos: grupo tratado com dieta hiperlipídica (HFD) e grupo tratado com dieta padrão (SC), ambos durante gestação e lactação. Após o nascimento, as proles foram igualadas em 8 filhotes por mãe e desmamadas no 18º dia de vida e passaram a se alimentar com dieta controle até 28º dia de vida. Então as proles macho foram divididas em dois subgrupos: proles de mãe que se alimentaram de dieta controle (SC-O) e proles de mãe que se alimentaram com dieta hiperlipídica, com 45% de gordura (HFD-O).

Os animais foram desafiados com LPS, administrado em uma concentração de 30mg/kg via intraperitoneal para indução do quadro de sepse nos animais e para os animais controle foi administrada salina (veículo). O grupo HFD-O recebeu, ainda, tratamento prévio com o agonista do receptor muscarínico, em uma concentração de 40µg/Kg de peso intracerebroventricular. Foi observado, então, a curva de sobrevivência e posterior análises moleculares após 10 horas dos estímulos.

As análises moleculares realizadas foram quantificação de citocinas no soro por Elisa e no baço por real-time q-PCR. Os resultados foram apresentados em média e erro padrão da média. Para a comparação de médias entre dois grupos, aplicamos o teste t de Student para amostras independentes. Quando necessário, foi utilizada análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey HSD para comparação múltipla de médias ($p < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando Prisma, versão 8.0.

3. Resultados

O consumo materno de dieta rica em gordura, leva a ativação de vias inflamatórias nas fases iniciais do desenvolvimento. Assim, a prole de mãe obesa apresenta maiores danos metabólicos após desafio inflamatório (Challier *et al.*, 2008; Linabery *et al.*, 2013; Yeung *et al.*, 2017). Para avaliar a resposta dessas proles à indução de sepse, os animais foram desafiados com LPS na dose de 30mg/Kg de peso e observou a sobrevivência, em intervalos de 1 hora durante 72 horas.

Portanto ao avaliar a curva a prole HFD-O apresentou maior sobrevivência em comparação com a prole SC-O, então a prole de mãe obesa parece ser protegida contra o quadro de sepse e

consequente mortalidade (Figura 1). Esta maior sobrevivência pode ser atribuída à maior expressão do receptor muscarínico do tipo m1 (M1mAChR) no hipotálamo nesse mesmo grupo (dados prévios do grupo não publicados).

Para confirmar a hipótese, o experimento foi repetido com a droga antagonista do receptor M1 mAChR, ICV, e assim as proles HFD-O apresentaram menor sobrevivência após inibição farmacológica do receptor (Figura 1). Deste modo, parece que o aumento da expressão do receptor muscarínico central nessas proles pode agir como um fator protetor nos animais HFD-O, aumentando a sobrevivência em casos de sepse.

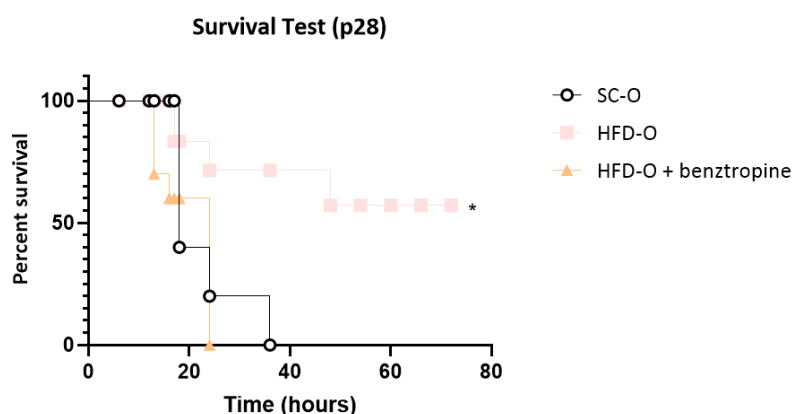


Figura 1. Teste de sobrevivência das proles. A. Teste de sobrevivência de proles machos de 28 dias (P28) de mães alimentadas com dieta hiperlipídica (HFD-O, n=05) e dieta controle (SC-O, n=05) durante a gestação e lactação e desafiadas com LPS IP na concentração de 30mg/Kg do animal. E um grupo foi tratado com antagonista icv, benztropine, na dose de 0,5uM/animal 30 minutos antes do desafio com LPS. Os animais foram observados em intervalos de uma hora durante 72 horas.

Em relação ao perfil inflamatório das proles, foi feita a análise de citocinas no soro dos animais. Comparando os grupos desafiados com LPS a prole HFD-O apresentou menores níveis de TNF- α e IL-10 comparados ao grupo SC-O (Figura 2A e B). O grupo HFD-O que foi estimulado com Benzotropine apresentou, ainda, níveis similares ao grupo SC-O desafiado com LPS e maiores que o grupo HFD-O (Figura 2A e B). Estes resultados nos sugerem que a circulação de citocinas no grupo HFD-O é menor e ao estimular as proles com antagonista de m1 o efeito é revertido.

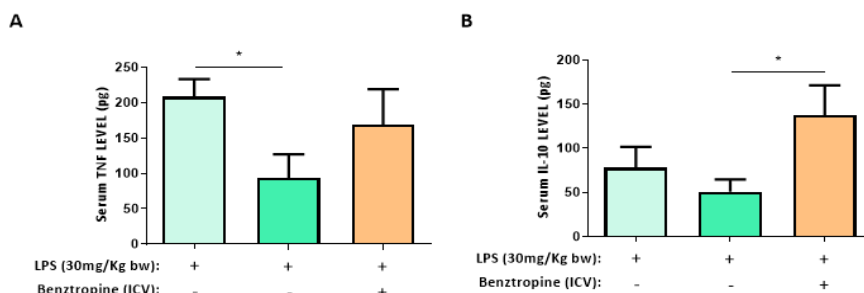


Figura 2. Quantidade de citocinas no soro das proles. A. Níveis séricos de TNF; B. Níveis séricos de IL-10. As quantidades de citocinas foram mensuradas por kit Elisa e normalizada pela quantidade de proteína (ug) de cada amostra. Teste t-student entre os grupos, *p \leq 0.05.

Por fim, para o perfil de citocinas e quimiocinas no baço foi feito o PCR, em que observamos um aumento dos níveis de mRNA de TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10 nos grupos SC-O e HFD-O, contudo no grupo HFD com LPS observamos menores níveis de mRNA de TNF (Figura 4A), IL-10

(Figura 4D) e das quimiocinas CCL2 (Figura 4E) e CXCL12 (Figura 4F) comparados com o grupo SC-O tratado com LPS. Ao comparar o grupo HFD-O tratado com LPS e com o antagonista do M1, este tende a aumentar os níveis de mRNA das citocinas e quimiocinas. Deste modo, os resultados mostram que a inflamação do baço das proles HFD-O desafiadas com LPS é menor comparado ao grupo SC-O e que ao tratar os animais com antagonista de m1 o efeito é revertido.

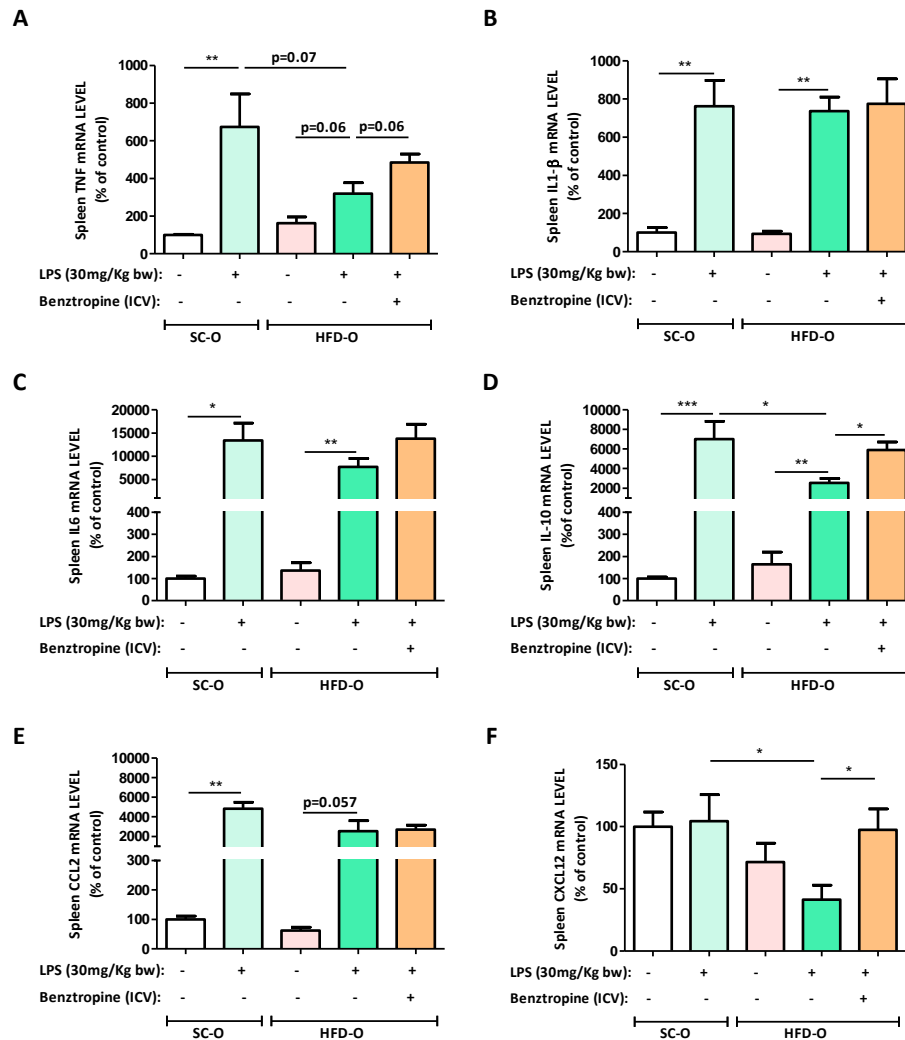


Figura 4. Níveis de mRNA por qPCR de TNF, **A**; IL-1 β , **B**; IL-6, **C**; IL-10, **D**; CCL2, **E**; CXCL12, **F**; no baço de proles (P28) de mães alimentadas com dieta hiperlipídica (HFD-O, n=05) e dieta controle (SC-O, n=05) durante a gestação e lactação e desafiadas com LPS IP na concentração de 30mg/Kg do animal e tratadas com antagonista icv, benztropine, na dose de 0,5uM/animal 30 minutos antes do desafio com LPS. O tecido foi coletado após 10 horas do desafio com LPS. A quantidade de mRNA foi normalizada pela quantidade de GAPDH. Anova entre os grupos, *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

4. Conclusão

Portanto o receptor muscarínico tipo M1 parece agir como um fator protetor contra sepse na prole de mãe obesa, sendo estas menos susceptíveis a morte. Isso pode ser atribuído a uma menor inflamação no soro e baço dos animais, efeito esse revertido quando inibimos o receptor muscarínico farmacologicamente.

5. Referências

ASHINO, N. G. *et al.* Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 4, p. 341–348, 2012.

BENATTI, R. O. *et al.* Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 12, p. 2112–2122, 2014.

CANCELLO, R. *et al.* The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ in subcutaneous mature adipocytes: downregulation in human obesity and modulation by diet-induced weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 12, p. 1552–1557, 2012.

CASTELLHEIM, A. *et al.* Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 6, p. 479–491, 2009.

DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; ROSS, M. G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 4, p. 633–641, 2015.

ESPOSITO, S. *et al.* Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 10, p. 204–212, 2017.

MELO, A. M. *et al.* Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 63, n. 5, p. 682–692, 2014.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 8, n. 12, p. 743–54, 2012.

PAYOLLA, T. B. *et al.* High-fat diet during pregnancy and lactation impairs the cholinergic anti-inflammatory pathway in the liver and white adipose tissue of mouse offspring. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 422, p. 192–202, 2016.

RAMACHANDRAN, G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 213–8, 1 jan. 2014.

SOLINAS, G.; KARIN, M. JNK1 and IKK : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 8, p. 2596–2611, 2010.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 418–428, 2009.

WHITAKER, R. C. *et al.* Predicting Obesity in Young Adulthood from Childhood and Parental Obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 13, p. 869–873, 25 set. 1997.