

Adaptações moleculares do ritmo circadiano em placenta de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

Palavras-Chave: [Ritmo circadiano], [Placenta], [Dieta hiperlipídica]

Autoras:

JÚLIA SILVA SALOMÃO [FCA, UNICAMP]

MSc. MAÍRA SCHUCHTER FERREIRA [FCA/UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a LETÍCIA MARTINS IGNÁCIO DE SOUZA (orientadora) [FCA/UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A obesidade é uma doença crônica não-transmissível de grande importância epidemiológica. Dentre suas etiologias, estudos de Programação Metabólica apontam que o estado nutricional pré-gestacional e gestacional pode ser um dos responsáveis pela maior prevalência da obesidade, pois a nutrição materna é capaz de programar o metabolismo de seus descendentes (CATALANO, 2007). Outro fator que pode contribuir para obesidade é a alteração no ritmo circadiano devido a modificações no comportamento alimentar e na homeostase glicêmica (CIPOLLA-NETO et al., 2014). Dentre os produtores de melatonina, hormônio regulador do ritmo circadiano, a placenta além de produzir esse hormônio é permeável a ele, sendo a produção materna a única fonte ao feto (LANOIX et al., 2008; OKATANI et al., 1998). Também sabe-se que a dieta afeta a expressão dos “clock genes” e,

consequentemente, provoca impactos no metabolismo (KOHSAKA et al., 2007). Desta maneira, o objetivo do presente estudo é avaliar alterações moleculares relacionadas ao ritmo circadiano em placenta de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica no período pré-gestacional e gestacional através de uma análise transcriptômica do sequenciamento de RNA (RNA-Seq).

METODOLOGIA:

Camundongos fêmeas Swiss, do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), foram submetidos ao seguinte protocolo experimental (CEUA 5401-1) (Figura 1).



Figura 1 – Protocolo Experimental

As dietas utilizadas no estudo foram: dieta padrão e dieta hiperlipídica e hipercalórica com 45% das calorias provenientes de gorduras, especialmente

banha de porco. Foi utilizada dieta hiperlipídica de manutenção no período anterior ao acasalamento e dieta hiperlipídica de crescimento durante o período gestacional (Tabela 1).

Para as análises dos grupos foram divididos em grupo controle (C), grupo *high fat* propenso (HFP) e grupo *high fat* resistente (HFR). A divisão entre os grupos *high fat* propenso e resistente se deu a partir da média do ganho de peso pré-gestacional (diferença entre peso do dia do acasalamento e do primeiro dia de dieta *high fat*); animais acima da média foram

considerados propensos à obesidade, e abaixo da média, resistentes à obesidade, uma adaptação de Simino et al, (2021). O tecido placentário coletado no último terço da gestação foi processado e o mRNA total foi levado ao sequenciamento do transcriptoma no Laboratório de Tecnologias da Unicamp (LaCTAD). Com a anotação funcional e o logaritmo da expressão, foram considerados transcritos diferencialmente expressos aqueles que apresentaram aumento ou diminuição de pelo menos 2,5 vezes e *p*-valor ajustado < 0,05.

Tabela 1. Composição centesimal estimada das dietas experimentais.

	Dieta Padrão ¹	Dieta Hiperlipídica Manutenção ²	Dieta Hiperlipídica Crescimento ²
Proteína líquida (g %)	22,5	14,2	20,0
Conteúdo de gordura (g%)	4,5	24,0	24,0
Carboidratos (g %)	55,0	49,3	42,0
Fibras (g %)	8,0	5,0	5,5
Cinzas (g %)	10,0	7,5	8,5
Total	100,0	100,0	100,0
Kcal/g	3,5	4,7	4,7

¹ (NUVILAB® Cr-1, Nuvital, PR - Brasil)

² Dieta modificada baseada no Instituto Americano de Nutrição, segundo Reeves et al (1993)

Após a obtenção da lista de transcritos *up-regulated* e *down-regulated* em cada uma das comparações (CxHFR, CxHFP e HFRxHFP), os transcritos foram submetidos à plataforma KOBAS que gerou uma lista de vias de enriquecimento, com as bases Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) e Gene Ontology (GO) para identificar as vias moleculares e processos biológicos diferencialmente expressos ($p < 0,05$), respectivamente. Ambas foram, através do Diagrama de Venny, apresentadas como exclusivas ou comuns às comparações. Por fim, foram selecionadas as

vias relacionadas com o ritmo circadiano (LEHMANN et al., 2015), descritas no Quadro 1.

Com base no Quadro 1, foram selecionados genes das vias elencadas e, utilizando a tabela do RNASeq, foram montados os *clusters* dos genes (grupo de genes que compartilham um fenômeno comum) na plataforma STRING (versão 9.0 com um corte de confiança de 0,9) e o *heatmap* no RStudio para relacionar tais genes modulados com os aspectos metabólicos e morfológicos encontrados previamente no nosso grupo de pesquisa.

Quadro 1. Vias moleculares e processos biológicos relacionadas com o ritmo circadiano diferencialmente moduladas na placenta nas comparações HFRxC, HFPxC ou HFRxHFP.

Vias moleculares <i>up-regulated</i> e <i>down-regulated</i> (KEGG)	Processos biológicos moleculares <i>up-regulated</i> e <i>down-regulated</i> (GO)
<i>Exclusivo em HFRxC</i>	<i>Exclusivo em HFPxC</i>
Protein processing in endoplasmic reticulum	DNA binding
<i>Exclusivo em HFPxC</i>	nucleolus
Progesterone-mediated oocyte maturation	nuclear pore
Spliceosome	<i>Exclusivo em HFRxHFP</i>
Purine metabolismo	Wnt signaling pathway
<i>Exclusivo em HFRxHFP</i>	DNA replication factor C complex
Nucleotide excision repair	regulation of circadian rhythm
Pyrimidine metabolismo	positive regulation of circadian rhythm
Colorectal cancer	Comum em HFPxC e HFRxHFP
<i>Comum em HFPxC e HFRxHFP</i>	cytosol
MAPK signaling pathway	chromatin
Pathways in câncer	chromatin binding
Mismatch repair	regulation of transcription, DNA-templated

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Há uma rede circadiana que regula centenas de genes e, a partir do modelo experimental deste estudo, encontrou-se 21 vias moleculares ou processos biológicos relacionados ao ritmo circadiano que foram diferencialmente expressas na placenta de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Devido ao fato de poucos transcritos estarem diferencialmente expressos na comparação HFRxC, não houve formação de *clusters* e do *heatmap*. Isso provavelmente confirma dados anteriores que mostram que animais resistentes à obesidade exibem um perfil muito semelhante aos controles (Simino et al, 2021), entretanto mais dados necessitam de investigação. Dentre os *clusters* de genes exclusivos entre os grupos HFPxC (Figura 2), encontra-se um *cluster* com os genes Tgif1 e Smad3. Sabe-se que a insulina induz a ativação de Smad3 devido ao aumento da sinalização autócrina de TGF-

β , o que contribui para respostas angiogênicas induzidas pela insulina, como o desenvolvimento da placenta (BURTON; JAUNIAUX, 2015). Em estudos anteriores do nosso grupo (dados ainda não publicados), animais com tendência à obesidade (HFP) apresentaram na placenta menor transcrição de Smad3, associada a prejuízo na sensibilidade à insulina e ruptura das camadas placentárias, o que confirma o descrito na literatura e nesta análise de RNASeq.

No *cluster* de genes exclusivos HFRxHFP (Figura 3) há os genes Tgfb2 e Tgfbr2 que são fator de crescimento transformador β 2 e seu transportador, respectivamente. O fator de crescimento transformador é uma citocina que regula a proliferação, diferenciação e capacidade de invasão de várias linhagens celulares; dentre elas as células da placenta (LAFONTAINE et al., 2011). Em resultados anteriores do nosso grupo (não publicado), foi visto que o grupo HFP teve menor eficiência placentária (peso

fetal:peso placentário), o que poderia estar envolvido com a menor expressão desse fator de crescimento em comparação ao grupo HFR.

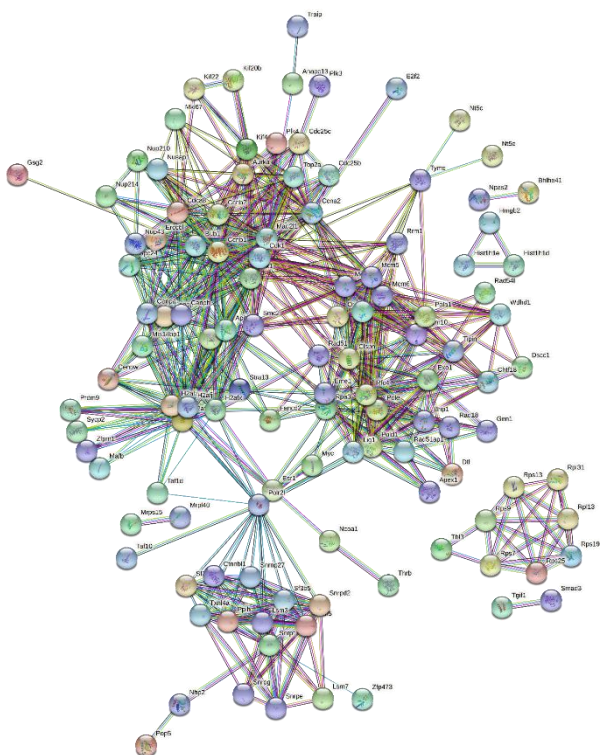


Figura 2 – Cluster de genes diferencialmente expressos das vias moleculares e processos biológicos modulados exclusivos da comparação HFPxC

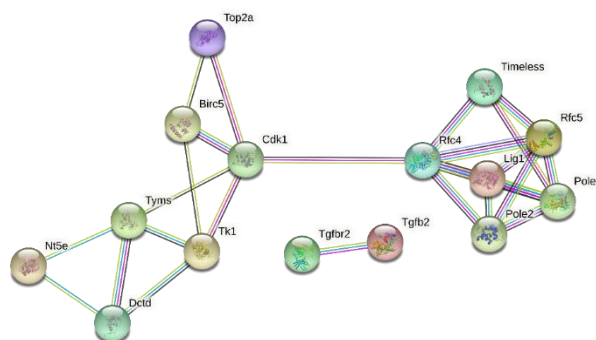


Figura 3 – Cluster de genes diferencialmente expressos das vias moleculares e processos biológicos modulados exclusivos da comparação HFRxHFP

Ademais, um dos *clusters* de genes exclusivos HFRxHFP (Figura 3) apresentou o gene *Timeless* (regulador circadiano atemporal), pertencente ao conjunto com outros genes relacionados ao ciclo celular. Isso porque o gene *Timeless* codifica uma

proteína, também chamada de *Timeless*, que é uma proteína de *checkpoint* que acopla diretamente o ciclo celular e o ritmo circadiano em humanos (ÜNSAL-KAÇMAZ et al., 2005). No presente estudo ele esteve *up-regulated* no grupo HFP em relação HFR. Outros genes relacionados ao ritmo circadiano também foram diferencialmente expressos, como *Npas2* e *Per1* que estiveram *down-regulated* no grupo HFP em relação ao grupo controle e *Per2* que foi menos expresso no grupo HFP em relação ao grupo HFR. Vale ressaltar, ainda que, alguns outros genes importantes para a avaliação dos clusters foram também modulados significativamente, porém menos de 2,5 vezes, como *Timeless* (2,4 vezes *up-regulated* no grupo HFPxC), *Per2* (2,3 vezes *down-regulated* no grupo HFPxC), *Cry1* (2 vezes *down-regulated* no grupo HFPxC) e *Per1* (1,9 vezes *down-regulated* no grupo HFPxHFR).

Por fim, os *heatmaps* produzidos pelos genes diferencialmente expressos das vias metabólicas e processos biológicos modulados exclusivos das comparações HFPxC e HFRxHFP estão apresentados na Figura 4 e Figura 5.

CONCLUSÕES:

Conclui-se que, segundo resultados de bioinformática, o consumo de dieta hiperlipídica durante os períodos pré-gestacional e gestacional parece modular vias metabólicas e processos biológicos relacionados com o ritmo circadiano. Essas modulações parecem influenciar a expressão de genes que estão associados ao prejuízo

na sensibilidade à insulina, ruptura das camadas placentárias e menor eficiência placentária além daqueles genes do próprio ritmo circadiano podendo causar impactos importantes no metabolismo da progênie. Tais desfechos deverão ser avaliados futuramente.

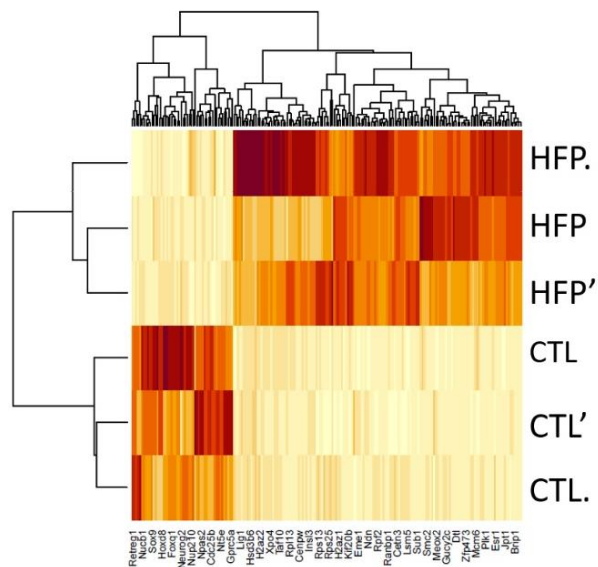


Figura 4 – Heatmap de genes diferencialmente expressos das vias moleculares e processos biológicos modulados exclusivos da comparação HFPxCT

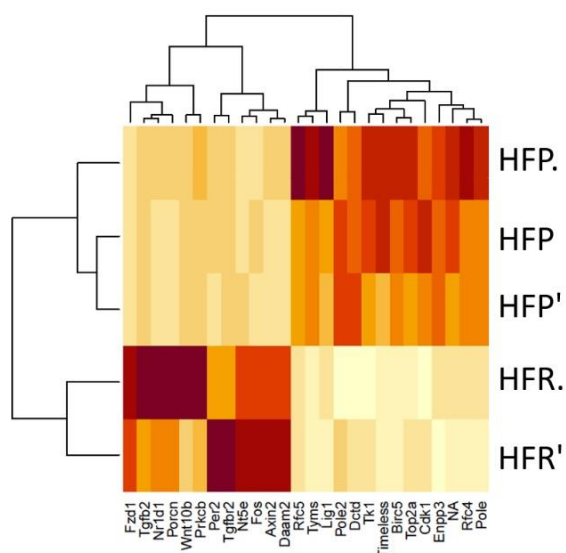


Figura 4 – Heatmap de genes diferencialmente expressos das vias moleculares e processos biológicos modulados exclusivos da comparação HFRxHFP

BIBLIOGRAFIA

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta? **American Journal of Obstetrics**

and Gynecology, v. 213, n. 4, p. S6.e1-S6.e4, 2015.

CATALANO, P. M. Management of obesity in pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 109, n. 2 PART 1, p. 419–433, 2007.

CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: A review. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 4, p. 371–381, 2014.

KOHSAKA, A. et al. High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 414–421, 2007.

LAFONTAINE, L. et al. Transforming growth factor beta regulates proliferation and invasion of rat placental cell lines. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 3, p. 553–559, 2011.

LANOIX, D. et al. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n. 1, p. 50–60, 2008.

LEHMANN, R. et al. Assembly of a comprehensive regulatory network for the mammalian circadian clock: A bioinformatics approach. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–28, 2015.

OKATANI, Y. et al. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. **Journal of Pineal Research**, v. 25, n. 3, p. 129–134, 1998.

ÜNSAL-KAÇMAZ, K. et al. Coupling of Human Circadian and Cell Cycles by the Timeless Protein. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 8, p. 3109–3116, 2005.