

# Avaliação da Estrutura Inflamassomal NLRP3/ASC/Caspase-1 no Fígado de Animais com Doença Celíaca

**Palavras-Chave:** Doença Celíaca, Inflamassomo, Hepatite

**Autores/as:**

**Giovana Rios Gonçalves<sup>1</sup>, Camila de Oliveira Ramos<sup>1</sup>, Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari<sup>1</sup>, Thaiane da Silva Rios<sup>1</sup>, José Rodrigo Pauli<sup>1</sup>, Eduardo Rochete Ropelle<sup>1</sup>, Leandro Pereira de Moura<sup>1</sup>, Adelino Sanchez Ramos da Silva<sup>1</sup>, Dennys Esper Cintra<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>UNICAMP – FCA.

\*Orientador.

---

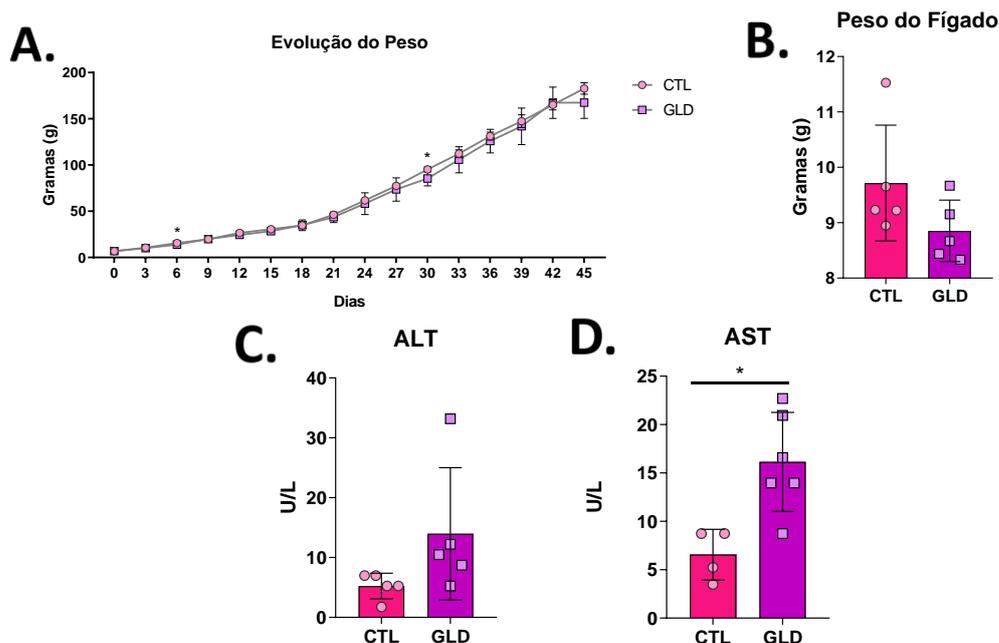
## INTRODUÇÃO

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia que acomete indivíduos geneticamente susceptíveis, mediada pelo sistema imune e desencadeada pela gliadina, proteína do glúten, presente na dieta<sup>1</sup>. Apesar do intestino ser o principal órgão afetado pela DC, sistemas extraintestinais, como o fígado, podem ser impactados<sup>2</sup>. Diante o contexto pró-inflamatório desencadeado pela DC, pode ocorrer ativação intracelular do complexo inflamassomal, composto pelas proteínas: receptor do tipo NOD (NLR); proteína adaptadora apoptótica (ASC); e a proteína efetora pró caspase-1 (CASP1). Ativação do inflamassomo indica presença de mais um componente da via inflamatória, responsável especificamente pela maturação das interleucinas (IL) 1 $\beta$  e 18. Com o arcabouço sinalizatório ampliado, o fígado pode avançar à inflamação grave. Dessa forma, o inflamassomo pode representar componente importante à progressão da doença celíaca<sup>3</sup>. Embora existam diversas evidências entre doença celíaca seguida de repercussões hepáticas, os mecanismos fisiopatológicos são pouco elucidados. O projeto avaliou a presença da estrutura inflamassomal hepática em animais tratados com gliadina.

## METODOLOGIA

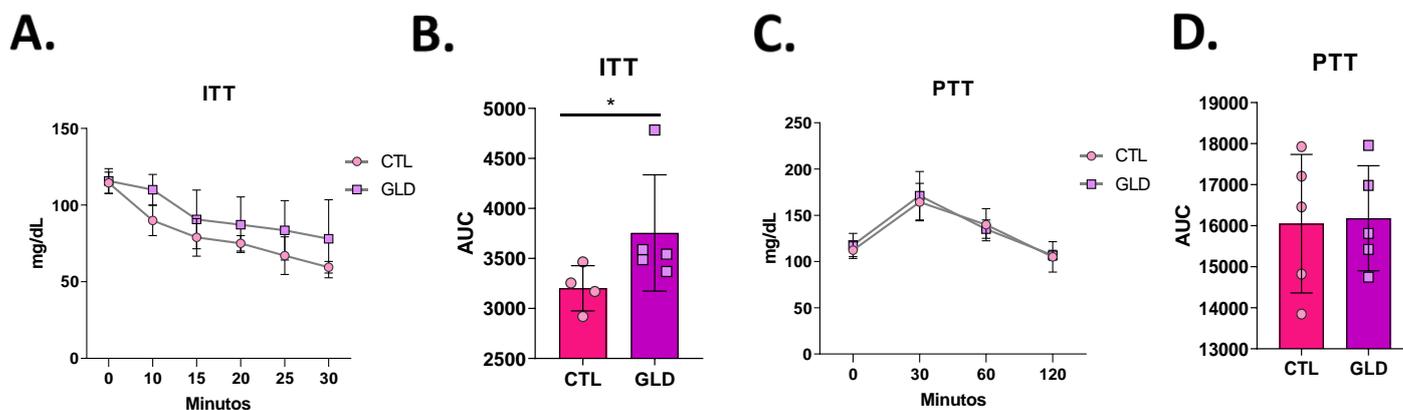
No presente projeto, foram utilizados ratos machos, Wistar, com 21 dias de idade, distribuídos em 2 grupos: grupo gliadina (GLD), em que receberam por gavagem a solução de gliadina (0,5% em ácido acético 0,02 M) a cada três dias, por 62 dias; grupo controle (CTL), tratado apenas com o veículo (0,02 M de ácido acético). Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados e os tecidos hepático e intestinal (duodeno e jejuno) foram coletados. Posteriormente foram realizadas as análises histológicas (hematoxilina e eosina), de sensibilidade à insulina (ITT) e biomoleculares (Western blotting e imunoprecipitação).

## RESULTADOS



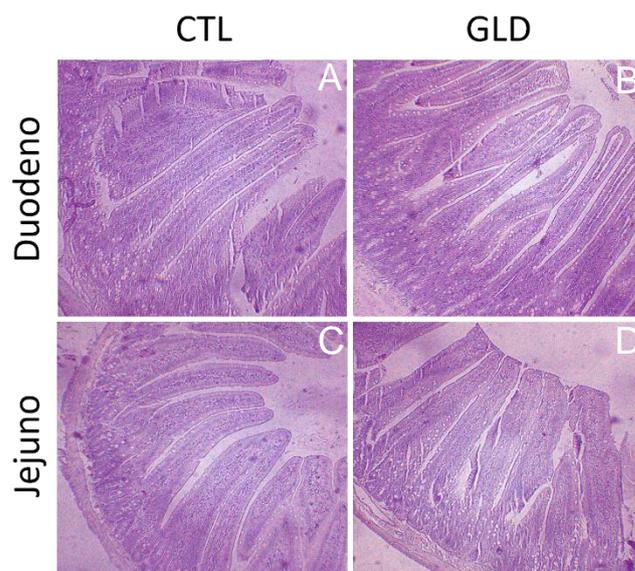
**Figura 1 – Evolução ponderal, peso do fígado e enzimas hepáticas dos animais experimentais.** (A) Massa corporal; (B) Peso do fígado; (C e D) Enzimas hepáticas ALT e AST. \* $P < 0.05$  CTL vs GLD. AST – Aspartato aminotransferase. ALT – Alanina aminotransferase.

Em comparação ao grupo controle, os animais tratados com gliadina apresentaram peso significativamente menor nos dias 6 e 30 (Fig. 1A). Quanto ao peso do fígado, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais (Fig. 1B). Ao serem avaliadas o conteúdo sérico das enzimas marcadoras de dano hepático, não houve aumento significativo para ALT (Fig. 1C), no entanto, a enzima AST diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) nos animais tratados com gliadina (Fig. 1D).



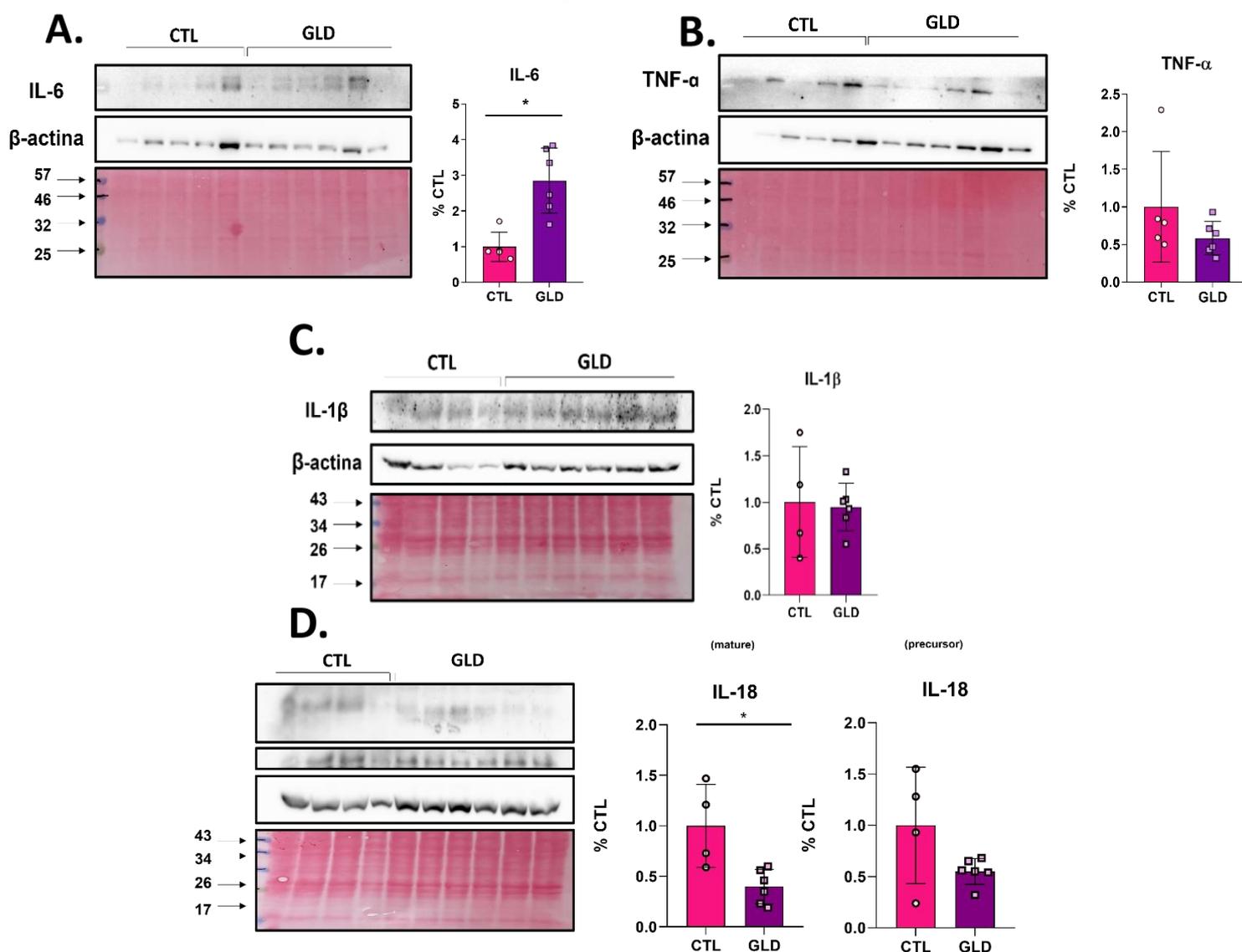
**Figura 2 – Teste de sensibilidade à insulina (ITT) e Teste de tolerância ao piruvato (PTT).** Curva glicêmica nos tempos: 0, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para o ITT (A) e PTT (C). Área sob a curva glicêmica dos durante o ITT (B) e PTT (D). \* $P < 0.05$  CTL vs GLD.

Durante a avaliação da curva de decaimento glicêmico durante o teste de sensibilidade à insulina, os tratamentos experimentais não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ) (Fig. 2A), entretanto, os valores da área sob a curva do grupo GLD foram maiores em relação ao grupo CTL (Fig. 2B) ( $P = 0,05$ ). Durante o teste de PTT, os tratamentos não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ) (Fig. 2C e D).



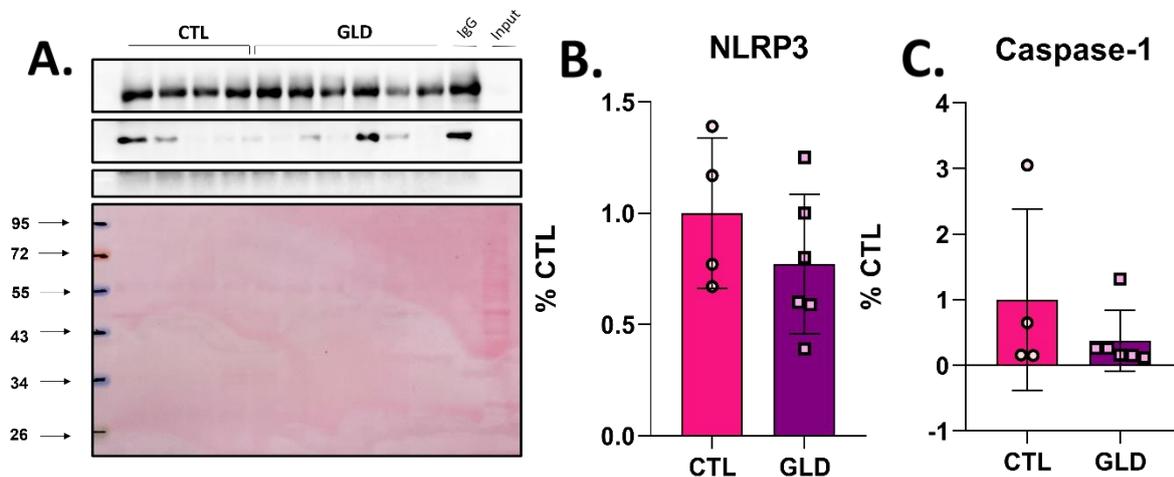
**Figura 3 – Morfologia Duodenal e Jejunal dos Grupos Experimentais.** Aumento: 10x. Coloração HE (Hematoxilina e Eosina).

Quanto as análises histológicas, nota-se que no grupo tratado com gliadina apresentou sutil atrofia apical das vilosidades do jejuno, quando comparados ao grupo CTL (Fig. 3C e D). Entretanto, não foi observado atrofia nas vilosidades duodenais (Fig. 3A e B).



**Figura 4 – Análise Hepática das Proteínas Pró-inflamatórias.** Extratos de proteína total do fígado dos grupos CTL e GLD foram coletados e analisados por Western blot. (A) IL6 e (B) TNF $\alpha$  CTL n = 5 e GLD n = 6. (C) IL1 $\beta$  e (D) IL18 CTL n = 4 e GLD n = 6. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística utilizada foi P <0,05 para o grupo CTL vs GLD.

Em relação as análises biomoleculares, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre o grupo CTL e GLD no que tange a proteína TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (Fig 4B-D), enquanto a IL18 madura esteve reduzida no grupo GLD em comparação ao CTL. Valores significativamente mais elevados de IL6 foram encontrados no fígado de animais do grupo GLD comparados ao CTL. (Fig. 4A).



**Figura 5 – Avaliação da Estrutura Inflamassomal ASC-NLRP3-Caspase-1.** (A) Associação entre proteínas após imunoprecipitação de ASC no tecido hepático nos grupos CTL (n=4) e GLD (n=6). (B) NLRP3/ASC. (C) Quantificação através da associação ASC/ANLRP3. Como controle de carregamento, foi utilizado o *input*. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística utilizada foi P <0,05 para o grupo CTL vs GLD.

Além disso, a associação do complexo inflamassomal NLRP3/ASC/Caspase-1, objeto de pesquisa do presente estudo, evidenciou que no grupo tratado com gliadina não apresentou aumento significativo em relação ao grupo CTL (Fig. 5B e C).

## DISCUSSÃO

A DC pode propagar seus efeitos danosos para além do intestino<sup>4</sup>. O presente projeto avaliou a presença de marcadores inflamatórios e da estrutura inflamassomal no fígado de roedores tratados com gliadina, a principal proteína associada à doença celíaca.

O tratamento com gliadina não induziu alteração no peso corporal dos animais, nem ao peso do fígado, quando comparados ao grupo CTL. Além dos sinais típicos gastrointestinais decorrente da DC, como diarreia e vômito, sistemas extraintestinais podem ser impactados, como o fígado. Um dos sintomas bem caracterizados da DC é a hipertransaminasemia que pode afetar tanto adultos como crianças<sup>5</sup>, com prevalência de 41,0% em pacientes no momento do diagnóstico de DC, sendo um fator de risco para diversas doenças hepáticas, como cirrose biliar primária e insuficiência hepática<sup>6</sup>. Contudo, a enzima AST apresentou elevação no sangue do grupo tratado com gliadina. A enzima AST é utilizada como marcador clássico de lesão hepatocelular<sup>7</sup>, e tem sido relacionada por outros autores à DC, suscitando provável comprometimento hepático induzido pela doença de base<sup>4</sup>.

O teste de tolerância à insulina mostrou que os animais tratados com gliadina apresentaram menor sensibilidade ao hormônio, uma vez que a glicemia esteve aumentada neste grupo quando comparado aos animais controle. Em 2017, ZHANG et al. analisaram animais tratados com dieta hiperlipídica acrescido de gliadina, a resistência à insulina, determinada pelo Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina (HOMA-IR), foi maior em comparação ao seu controle sem gliadina. Apesar desse estudo corroborar os dados aqui demonstrados, a resistência à insulina foi atribuída à modulação da microbiota intestinal, à qual induziu disbiose e, consecutivamente, endotoxemia. Assim, é possível que o aumento na glicemia tenha sido

induzido por alterações na produção hepática de glicose ou mesmo em sua captação por tecidos como músculo e adiposo, secundariamente à endotoxemia<sup>8</sup>.

Diante o contexto pró-inflamatório da DC, a ativação de TLRs é a primeira etapa para induzir ativação intracelular do complexo inflamassomal. Essa ativação, por sua vez, regula positivamente a transcrição de genes que compõem sua própria estrutura, como NLRP3 inativo, que se se associa à proteína ASC (proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD) e caspase-1<sup>9</sup>. A ativação do complexo inflamassomal é capaz de maturar e ativar as proteínas IL1 $\beta$ , IL18 e GSDMD (gasdermin D), aumentando o tônus inflamatório local, uma vez que a GSDMD forma poros na membrana plasmática e permite a liberação de IL1 $\beta$  e IL18 maduras ao espaço extracelular. A intensificação desse processo induz à morte celular piroptótica<sup>3</sup>. Neste trabalho não foi evidenciada a participação do inflamassomo induzido pelo tratamento com gliadina. Neste sentido, é possível inferir que o tônus inflamatório hepático não foi o bastante para sua ativação. Contudo, e de forma interessante, a proteína IL6 apresentou conteúdo elevado no grupo GLD, sendo um reconhecido marcador pró-inflamatório. A IL6 é uma citocina inflamatória importante no desenvolvimento da doença celíaca, produzida em resposta a danos intestinais, com atuação na mediação das respostas imunes e adaptativas<sup>10</sup>. Entretanto, a ação da IL6 no fígado continua sendo uma incógnita. As células de Kupffer detectam sinais de estresse intracelular por meio dos receptores TLRs (*toll-like*), e induzem produção de diversas citocinas, entre elas a IL6. Apesar de estar relacionada ao processo inflamatório e até mesmo ao desenvolvimento de fibrose hepática<sup>9</sup>, a IL6 é apontada como uma das principais proteínas envolvidas no reparo tecidual, sendo apontada como responsável por impedir a progressão da doença hepática<sup>11</sup>.

Na análise do contexto inflamatório, foi identificado neste trabalho que ambas as proteínas IL1 $\beta$  e IL18, duas interleucinas maturadas e ativadas pelo inflamassomo<sup>3</sup>, não estiveram elevadas no grupo GLD, nem tampouco o TNF $\alpha$ . Portanto, apesar das doses de gliadina utilizadas no presente estudo estarem embasadas em literatura<sup>12</sup>, não foi suficiente para causar danos expressivos no tecido hepático, baseado principalmente pela sutil atrofia das vilosidades no intestino (jejuno) o que, por sua vez, pode impactar diretamente nas repercussões hepáticas ocasionada pela doença celíaca e a ativação do complexo inflamassomal NLRP3/ASC/Caspase-1 no fígado.

Tomando-se o conjunto de dados, as alterações evidenciadas não foram capazes de induzir danos hepáticos significativos. Entretanto, é importante a observação e acompanhamento das alterações metabólicas iniciais, a fim de que a doença não progrida. Apesar do trabalho não ter fechado a definição de nenhum mecanismo fisiopatológico de conexão entre as doenças, ressalta-se a necessidade de continuidade investigativa do modelo experimental, já que é possível que a gliadina altere a permeabilidade intestinal. Assim, o dano poderia se estender a tecidos extra-intestinais, mas talvez seja dependente de mais tempo para surgimento do fenótipo.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com gliadina repercutiu em alterações hepáticas, evidenciada pelo aumento de AST podendo indicar danos no fígado, juntamente com o aumento significativo de IL6, acompanhada de menor sensibilidade à insulina. Esses efeitos extraintestinais podem estar relacionados à atrofia sutil das vilosidades no jejuno. Entretanto, essas alterações não foram suficientes para o aumento do complexo inflamassomal NLRP3/ASC/Caspase-1 o que, por sua vez, pode estar relacionado as doses de gliadina utilizada no presente estudo.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
2. *Nutrients*. 2018 Aug 3;10(8):1015.
3. *Front Immunol.* 2018 Sep 25;9:2201.
4. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **9**, 116–124 (2021).
5. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **63**, 340–343 (2016).
6. *Am. J. Gastroenterol.* **110**, 1216–1222 (2015).
7. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* **47**, 539–553 (2017).
8. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
9. *World J. Hepatol.* **10**, 1–7 (2018).
10. *Iran. Biomed. J.* **24**, 335–341 (2020).
11. *J. Hepatol.* **42**, 548–556 (2005).
12. *Nutrients* **10**, 1–17 (2018).