



Avaliação do potencial anti-inflamatório do ácido graxo ômega 3 nos rins de camundongos obesos e diabéticos

Palavras-Chave: Nefropatia, Diabetes tipo 2, Ômega 3.

Autores/as:

Lavinia Tolentino Lopes; Camila de Oliveira Ramos;
Susana C. B. R. Nakandakari; Thaiane S. Rios;
Prof. Dr. Dennys Esper Cintra.

Introdução

A obesidade é uma doença de caráter crônico e não transmissível (DCNT), considerada de ordem pandêmica. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 1,9 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso e 650 milhões se encontravam obesos, em 2016 (WHO, 2021). Esta prevalência de sobrepeso e obesidade aumentou e continuará aumentando nas próximas décadas, assim como as comorbidades associadas à obesidade, dentre elas o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (WHO, 2021). A inflamação crônica, de baixo grau, característica da obesidade (ZAGO et al., 2013), sinaliza diversos processos intracelulares que podem desencadear a resistência à insulina, sendo este processo um importante fator para gerar as comorbidades associadas, principalmente o DM2 (FREEMAN; PENNING, 2020). O número de pessoas com diagnóstico de diabetes (DM) foi de aproximadamente 537 milhões de adultos em 2021, e a estimativa é que esse número aumente ainda mais nos próximos anos.

O descontrole dos índices glicêmicos no DM2 pode conduzir a outras comorbidades, como a nefropatia diabética (ND) (SCHLIENGER, 2013). Esta, por sua vez, pode ser intensificada pelo estado inflamatório da obesidade, antecipando a falência renal. O caráter inflamatório da obesidade é proveniente do consumo exagerado de gorduras saturadas e açúcares na alimentação (ENGIN, 2017), e intensificada pela secreção de adipocinas por adipócitos hipertrofiados (HERBERT et al., 2018). Conseqüentemente, ocorre aumento na produção e liberação à corrente sanguínea de citocinas inflamatórias por macrófagos pró-inflamatórios infiltrados nos tecidos, que juntamente com o estresse oxidativo, hipóxia e lipólise amplifica a inflamação (HERBERT et al., 2018).

A ND apresenta origem mista, sendo a maior causa de doença renal em estágio terminal (SCHLIENGER, 2013). Alterações hemodinâmicas, ativação da sinalização de NFκB (fator nuclear kappa B) e a superexpressão de várias citocinas inflamatórias se associam à hiperglicemia persistente, e desempenham importante ação na patogênese da ND (HUANG et al., 2020). Portanto, estratégias anti-inflamatórias de ação sistêmica ou tecido-específico precisam ser melhor exploradas, como o potencial do GPR120 (Receptor 120 acoplado à proteína G) que inibe a cascata sinalizatória da inflamação (Zhi D. et al., 2020), podendo servir como medida preventiva ao desenvolvimento de comorbidades associadas ao DM, como a ND, e mesmo a própria DM2. Dessa forma, a presente pesquisa teve como objetivo elucidar o potencial anti-inflamatório do ácido graxo ALA (ácido alfa-linolênico), via ativação de GPR120, na prevenção da ND.

Metodologia

2.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss albinus, machos, com quatro semanas de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram separados nos seguintes grupos experimentais: controle (CT), obeso alimentado com dieta hiperlipídica (HF) e obeso tratado com dieta hiperlipídica com óleo de semente de linhaça (FS).

Os animais receberam água e dieta ad libitum e foram acondicionados em ambiente controlado, em temperatura ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) e fotoperíodo (12/12 horas claro/escuro). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas com o número de protocolo 5933-1/2022.

2.2 Delineamento experimental

Com objetivo de induzir obesidade e resistência à insulina, durante oito semanas os animais receberam dieta hiperlipídica (high-fat diet – HF). Esta dieta foi baseada no modelo proposto por Reeves et al., (1993), com seu conteúdo lipídico modificado de 4% para 35%, em que 4% é oriundo do óleo de soja e 31% de gordura suína, fonte de ácidos graxos saturados. Após instalação da obesidade e resistência à insulina, os animais foram redistribuídos em dois outros grupos, onde um grupo continuou a receber HF e outro que recebeu HF com substituição de 1/3 da gordura suína por óleo de semente de linhaça (FS – flaxseed) por mais 8 semanas. O CT foi mantido em ração comercial (Nuvilab®).

2.3 Coleta do tecido renal

Após o período experimental, os animais foram mantidos em jejum por 8 horas, sendo posteriormente anestesiados com ketamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). Após perda dos reflexos pedais e corneais, foi realizada a punção cardíaca. Os rins foram coletados e armazenados para as análises de Western blot, cromatografia, RT-qPCR e histologia, conforme a metodologia para cada tipo de análise.

2.4 Análise protéica por Western Blotting

Foi realizada a detecção, análise e quantificação das interleucinas 6 e 1 β , TNF α , GPR120, F4/80 e da proteína da via da insulina pAKT do tecido renal.

2.5 Análises de expressão gênica por Real Time – qPCR

Foi realizada a análise de expressão dos genes das interleucinas 6 e 1 β , bem como a expressão gênica do TNF α .

2.6 Histologia e Microscopia Confocal

Foi realizada a análise histológica para investigar alterações na estrutura renal, como área do tufo glomerular e depósito de colágeno.

2.7 Análise Estatística

As variáveis em estudo foram submetidas ao teste de normalidade por Shapiro Wilk, seguido pelo teste de igualdade de variância Bartlett's. Para dados normais, foi utilizado o teste One-Way ANOVA com post-test de Bonferroni. Para dados com distribuição não normal, foi usado o teste de Kruskal Wallis. O número amostral para cada análise variou de 4 a 5 por grupo. Os outliers foram retirados quando indicados pelo teste de Grubbs nas análises de expressão gênica por RT-qPCR. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão da média. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com auxílio da versão demonstrativa do software GraphPad Prism®, v8.0.1.

Resultados e Discussão

Segundo Zhi D. et al. (2020), o receptor GPR120 bloqueia a progressão do processo inflamatório à apoptose, ao inibir as citocinas como TNF α (fator de necrose tumoral-alfa), iNOS (sintase do óxido nítrico induzível) e as interleucinas (IL) 6 e 1 β , em células epiteliais tubulares renais. Assim, os principais agonistas do GPR120, os ácidos graxos ômega-3 ($\omega 3$), poderiam exercer ação anti-inflamatória nas células renais, prevenindo agravos referentes ao DM2. Young Oh et al. (2010) avaliaram os efeitos anti-inflamatórios de $\omega 3$, e comprovaram que pela ativação do receptor GPR120 por agonistas naturais como EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico), há

inibição da inflamação. Além disso, sabe-se que o $\omega 3$ de origem vegetal, o ALA, possui potencial de ativação semelhante aos EPA e DHA (CINTRA et al., 2012).

A resposta anti-inflamatória via GPR120, se dá pela estimulação do receptor pelo $\omega 3$ que inibe as respostas inflamatórias por TLR4 (receptor do tipo Toll) e $TNF\alpha$ (Young Oh et al., 2010). A sinalização disparada pelo GPR120 bloqueia a proteína TAK1 (Kinase 1 ativada pelo TGF-beta), a qual recebe e propaga os sinais das cascatas dos receptores de citocinas e também do TLR4. Desta forma, sua interrupção reduz de forma contundente o tônus inflamatório (Young Oh et al., 2010). Isso ocorre quando o GPR120 atrai para sua base a proteína β -arrestina2, que quando se desloca ao receptor, leva consigo a proteína TAB1, responsável por fosforilar e ativar TAK1, desarticulando o processo inflamatório (Young Oh et al., 2010).

Para elucidar se de fato o GPR120 via ativação por $\omega 3$ poderia inibir a inflamação no tecido renal no modelo in vivo, realizamos a detecção, análise e quantificação por Western Blotting de algumas das principais citocinas envolvidas no processo inflamatório quando em quantidades suprafisiológicas: $TNF\alpha$, IL6 e IL1 β , bem como o conteúdo proteico de GPR120, F4/80 (marcador de macrófagos), e de pAKT, proteína chave na via da insulina.

Nossos resultados apontaram que não houve diferença estatística entre os grupos em nenhuma das proteínas quantificadas, exceto F4/80. Este último resultado indicou que a dieta HF aumentou o recrutamento de macrófagos no tecido renal, mas que o tratamento com óleo de semente de linhaça foi capaz de prevenir tal desfecho (Fig.1). Além disso, também avaliamos a expressão gênica das citocinas $TNF\alpha$, IL6 e IL1 β , e também não houve diferença estatística entre os grupos, com exceção da IL6, que apresentou diferença estatística entre o grupo controle e o high-fat diet (Fig.2), apontando que, curiosamente, os animais que consumiram a dieta hiperlipídica tiveram uma diminuição da expressão gênica da IL6 em comparação com o CT.

Fig. 1 - Quantificação por Western Blotting

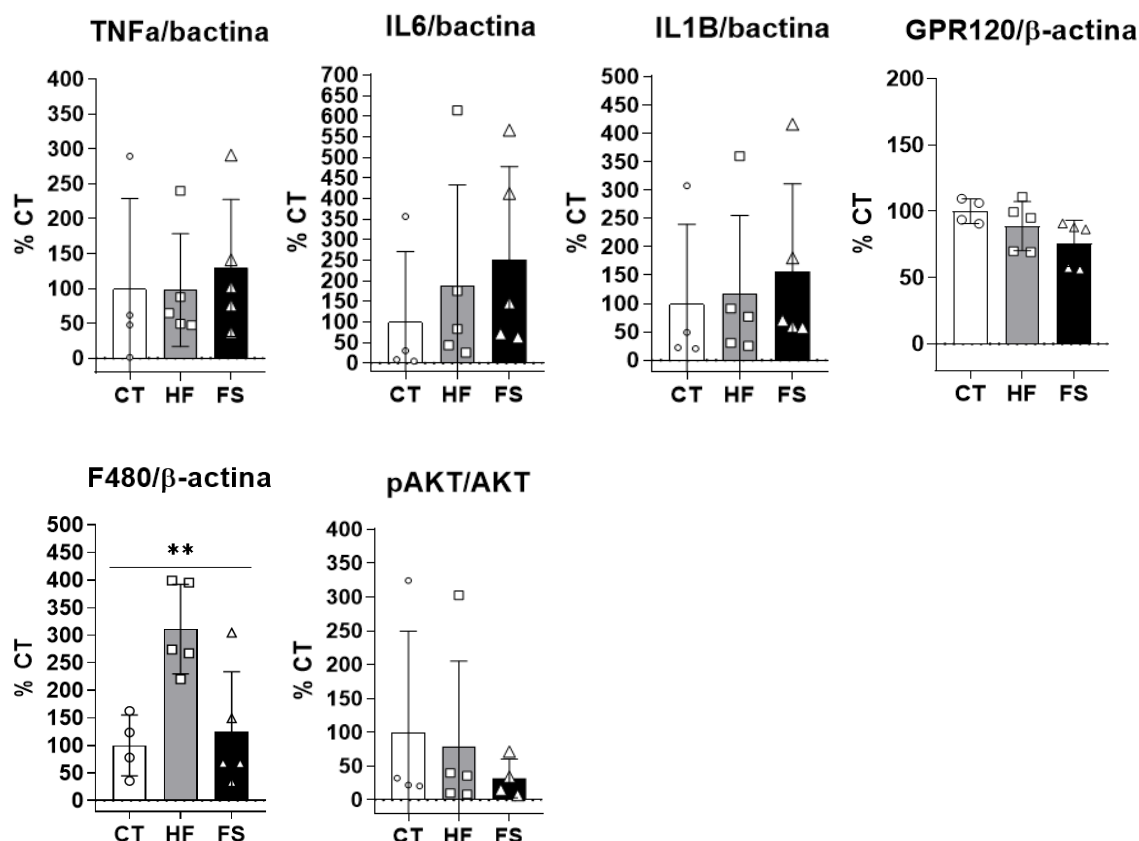
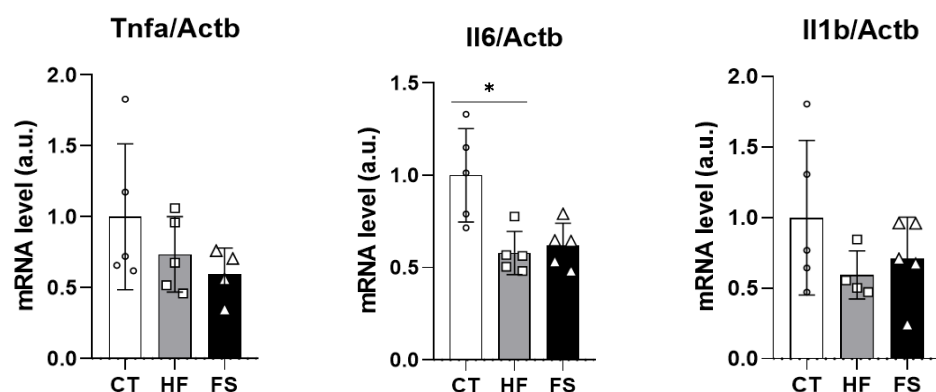
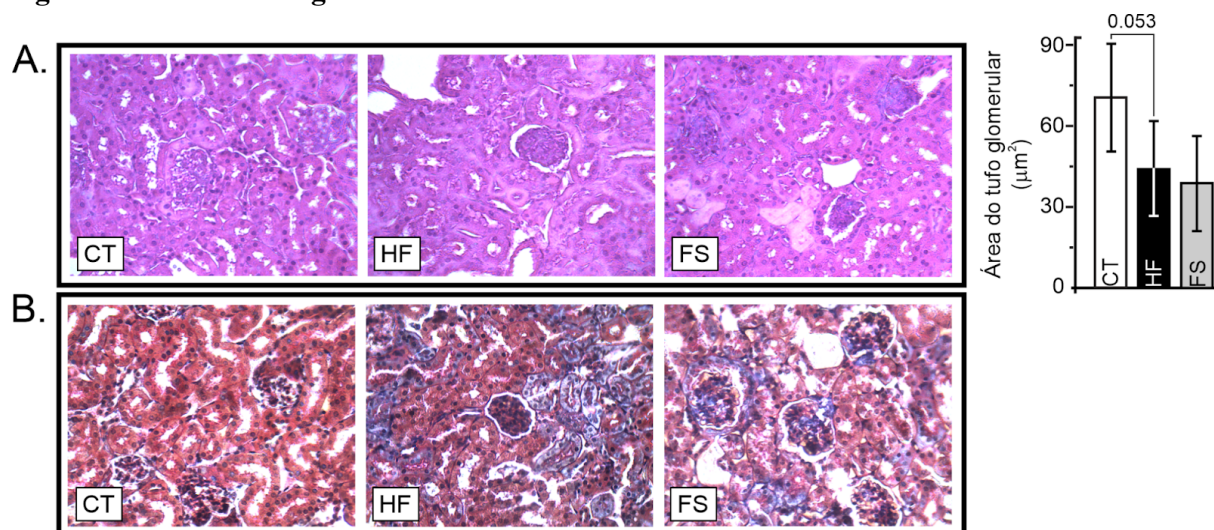


Fig. 2 - Análise da expressão gênica por RT-qPCR



Para mais, a análise histológica aponta que houve diferença estatística da área do tufo glomerular entre o grupo CT vs. HF, expondo que os animais que receberam a dieta hiperlipídica sofreram uma diminuição da área do tufo glomerular (Fig. 3), mas que não houve diferença estatística entre o grupo HF e FS. Ademais, analisamos qualitativamente o depósito de colágeno nas estruturas renais, indicando que o grupo que recebeu a dieta rica em gordura apresentou significativo depósito de colágeno, o que caracteriza franca fibrose.

Fig. 3 - Análise Histológica



Comparando nossos achados com a literatura no modelo in vivo, Chenxu et al. (2021) detectaram em suas análises aumentos significativos da expressão gênica por RT-qPCR de TNF α , IL6, IL1 β , IL18 e CCL2 no tecido renal de camundongos alimentados com dieta HF, indicando ativação da resposta inflamatória e infiltração celular. Entretanto, para quantificar o conteúdo proteico indicativo de inflamação, o estudo utilizou marcadores incomuns de inflamação, como F4/80 e CD68, marcadores de macrófagos. Qiang et al. (2021), também examinaram os níveis de RNAm de TNF α , IL1 β , IL6 e MCP1 em camundongos alimentados com dieta HF, obtendo como resultado o aumento acentuado dos níveis de tais citocinas/quimiocina em amostras de rins, e também no soro, por análise de ELISA. Entretanto, para indicar o conteúdo proteico inflamatório, os pesquisadores observaram a fosforilação de IKK α , I κ B α e NF-kB/p65 e não das citocinas analisadas por RT-qPCR e ELISA.

Atualmente, não há descrições na literatura sobre a capacidade de melhora no estado inflamatório do sistema renal sob tratamento dietético com dietas contendo fontes vegetais de ω 3, ou mesmo menção sobre a ação do receptor GPR120 ativado por este nutriente em específico no tecido

renal. Mais estudos in vivo precisam ser realizados para melhor esclarecer estratégias dietéticas que minimizem a inflamação, bem como seus danos decorrentes no tecido renal.

Conclusão

A dieta HF não foi capaz de induzir resposta pró-inflamatória robusta no tecido renal de camundongos. Isso pode ser atribuído ao reduzido tempo de consumo de dieta, uma vez que houve infiltração de macrófagos no parênquima renal, sinalizando o início do desbanço funcional tecidual. Assim, seguindo tal semelhança, o tratamento com fonte alimentar de $\omega 3$ não alterou o padrão de resposta em marcadores proteicos inflamatórios, uma vez que não houve inflamação induzida por dieta HF. Como dado que corrobora a ausência inflamatória, ambas as dietas não promoveram ação sobre a sensibilidade à insulina marcada pelo padrão de fosforilação de AKT. Contudo, a dieta rica em gordura saturada promoveu diminuição da área do tufo glomerular, induziu maior deposição de colágeno nos rins, seguido de maior recrutamento de macrófagos, e neste último ponto, o tratamento com $\omega 3$ foi eficaz em atenuar tal resposta.

Referências

- Chenxu G, Xianling D, Qin K, Linfeng H, Yan S, Mingxin X, Jun T, Minxuan X. Fisetin protects against high fat diet-induced nephropathy by inhibiting inflammation and oxidative stress via the blockage of iRhom2/NF- κ B signaling. *Int Immunopharmacol.* 2021 Mar;92:107353. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107353. Epub 2021 Jan 8. PMID: 33429334.
- CINTRA, DE.; ROPELLE, ER.; MORAES, JC.; PAULI, JR.; MORARI, J; SOUZA, CT; GRIMALDI, R; STAHL, M; CARVALHEIRA, JB.; SAAD, MJ.; Velloso LA.. Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. *Plos One*, 2012; 7, 1:30571.
- Engin A.B. (2017) What Is Lipotoxicity?. In: Engin A., Engin A. (eds) Obesity and Lipotoxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 960. Springer, Cham.
- Freeman AM, Pennings N. Insulin Resistance. 2020 Jul 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 29939616. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507839/>
- HERBERT D, Franz S, Popkova Y, Anderegg U, Schiller J, Schwede K, Lorz A, Simon JC, Saalbach A. High-Fat Diet Exacerbates Early Psoriatic Skin Inflammation Independent of Obesity: Saturated Fatty Acids as Key Players. *J Invest Dermatol.* 2018 Sep;138(9):1999-2009.
- Huang W, Man Y, Gao C, Zhou L, Gu J, Xu H, Wan Q, Long Y, Chai L, Xu Y, Xu Y. Short-Chain Fatty Acids Ameliorate Diabetic Nephropathy via GPR43-Mediated Inhibition of Oxidative Stress and NF- κ B Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Aug 1;2020:4074832.
- Li Q, Ge C, Tan J, Sun Y, Kuang Q, Dai X, Zhong S, Yi C, Hu LF, Lou DS, Xu M. Juglanin protects against high fat diet-induced renal injury by suppressing inflammation and dyslipidemia via regulating NF- κ B/HDAC3 signaling. *Int Immunopharmacol.* 2021 Jun;95:107340. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107340. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33667999.
- OBESEITY AND OVERWEIGHT. World Health Organization, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 21/07/2022.
- OH, Da Young; TALUKDAR, Saswata; BAE, Eun Ju; IMAMURA, Takeshi; MORINAGA, Hidetaka; FAN, Wuqiang; LI, Pingping; LU, Wendell J.; WATKINS, Steven M.; OLEFSKY, Jerrold M.. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*, [S.L.], v. 142, n. 5, p. 687-698, set. 2010. Elsevier BV.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* 1993; 123, 11:1939-1951.
- SCHLIENGER, Jean-Louis. Complications du diabète de type 2. *La Presse Médicale*, [S.L.], v. 42, n. 5, p. 839-848, maio 2013. Elsevier BV.
- ZAGO, Alexandre; FABRIZZI, Fernando; RODRIGUES, Washington; OLIVEIRA, Luis Carlos Nobre de; MITIDIERO, Juliana; JOKURA, André. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO ESTADO INFLAMATÓRIO CRÔNICO DE BAIXO GRAU INDUZIDO PELA OBESIDADE. *Revista Odontológica de Araçatuba, Araçatuba*, v. 34, n. 2, p. 27-32, 2013.
- Zhi, D., Zhang, M., Lin, J. et al. GPR120 Ameliorates Apoptosis and Inhibits the Production of Inflammatory Cytokines in Renal Tubular Epithelial Cells. *Inflammation* 44, 493-505 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01346-2>.
- Zhi, D., Zhang, M., Lin, J. et al. GPR120 Ameliorates Apoptosis and Inhibits the Production of Inflammatory Cytokines in Renal Tubular Epithelial Cells. *Inflammation* 44, 493-505 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01346-2>.