



Papel da subunidade alfa 7 do receptor nicotínico colinérgico ($\alpha 7nAChR$) na permeabilidade do cólon de camundongos com consumo de dieta hiperlipídica

Palavras-Chave: CÓLON, PERMEABILIDADE, COLINÉRGICO

Autores(as):

MARIA EDUARDA MARQUES CLEMENTE, FCA – UNICAMP

CAROLINE LOBO COSTA (coorientadora), FCA - UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). MARCIO ALBERTO TORSONI (orientador), FCA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) são diretamente influenciadas pelas vias inflamatórias, o que torna essenciais os mecanismos que auxiliem na redução de citocinas. A via anti-inflamatória colinérgica inibe a produção de citocinas através da ativação de receptores $\alpha 7nAChR$ por acetilcolina (DI GIOVANGIULIO et al., 2016; WANG et al., 2003). No intestino, essa via é ativada através dos nervos mioentéricos presentes na parede intestinal que conduzem a produção de acetilcolina (ACh) (MATTEOLI et al., 2014). A literatura tem mostrado que o receptor $\alpha 7nAChR$ tem sua expressão modulada por condições inflamatórias, o que foi demonstrado no estudo do nosso grupo com modelo animal que observou a redução da expressão desse receptor no hipotálamo após o consumo de HFD em apenas 3 dias (SOUZA et al., 2019). As alterações na barreira intestinal e o aumento da permeabilidade foram relatados por Genser et al. em indivíduos obesos, mostrando que a dieta rica em lipídios comprometia a barreira intestinal devido a alterações da microbiota intestinal (GENSER et al., 2018). Isso leva à proliferação de patógenos e mudança da capacidade metabólica, resultando na disbiose (CANI et al., 2009). Outro efeito da dieta observado foi o aumento significativo da permeabilidade intestinal através da redução na expressão de proteínas componentes das “*Tight junctions*” (TJ) (CANI, et al., 2007; CANI; DELZENNE, 2007). Algumas das principais proteínas de junção identificadas foram a zonula occludens-1 (ZO-1), que atua na ancoragem de células (SILICIANO; MOOSEKER, 1986), e as claudinas, que desempenham o papel de barreiras ou poros, tal como a claudina-2 (LU et al., 2013). Um estudo de 2007 mostrou que a inflamação associada à obesidade em camundongos também tem origem no intestino, mais precisamente através do extravasamento de moléculas específicas derivadas da microbiota intestinal, como o lipopolissacarídeo (LPS), uma condição denominada endotoxemia metabólica (CANI, et al., 2007). Dessa forma, ligação de LPS ao *Toll-like receptor 4* (TLR4) desencadeia uma via de sinalização de citocinas pró-inflamatórias que leva a uma resposta inflamatória (CANI, et al., 2007).

METODOLOGIA:

Inicialmente, foram utilizados animais machos da linhagem *C57BL/6* (*Wild Type*) com 6 semanas de vida ($n = 10$ animais/grupo) obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP) e os procedimentos realizados foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP) (**Fig.1**). A distribuição dos animais entre dois grupos experimentais, um com dieta controle (9%) e outro com dieta hiperlipídica (HFD 45%) ocorreu aleatoriamente.

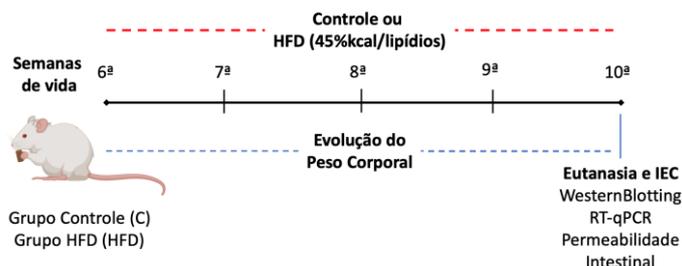


Figura 1 Desenho experimental do presente estudo (Fonte: O autor, 2022).

A HFD foi produzida no Laboratório de Técnica Dietética da FCA com ajustes de nutrientes e de valor calórico a partir da dieta controle, visando aumentar a densidade calórica e fornecimento de lipídios (**tabela 1**).

Tabela 1 Tabela comparativa da composição nutricional da dieta hiperlipídica e da dieta padrão utilizadas durante os experimentos.

Ingredientes	Dieta Padrão(g%)	Dieta Hiperlipídica 45% (g%)
Carboidrato	66	44
Fonte Proteica	20	20
Lipídios	4	23
Fibras	5	5
Minerais	3,5	3,5
Vitaminas	1	1
L-cistina	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Calorias de gordura (%/100g)	9	45
Valor calórico (KJ/100g)	1591	1939

Obtenção de células epiteliais intestinais (IEC). Os cólons foram abertos longitudinalmente e lavados três vezes com tampão fosfato (PBS) gelado (8°C). IEC foram isolados usando 2 mM EDTA/HBSS a 37°C com agitação durante 60 min. Os tubos foram agitados em vórtex por 20 segundos a cada 10 minutos, o material foi passado em um filtro de 70 µm e centrifugado (800G /10min a 4°C). O pellet de células obtido foi lavado uma vez com 20 mL de PBS (0,9%) e ressuspendidas em 1 mL de PBS, contadas em câmara de Neubauer para a utilização de 2×10^6 de célula.

A avaliação da expressão gênica foi realizada através de real-time PCR (qRT-PCR) utilizando os primers SIRT1, CHRNA7, IL-6, TNFalfa, IL-1B, IL-10 e proteínas de permeabilidade (Ocludina, ZO-1, Claudina 1 e 2), com o sistema de detecção TaqMan para os genes alvo.

O conteúdo proteico obtido do processamento do IEC foi quantificado (*BCA protein assay kit*) e posteriormente diluídos em tampão de *Laemmli*. As proteínas foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE), transferidas para membrana de nitrocelulose e os resultados avaliados através do blotting com anticorpos específicos: SIRT1, NF- κ B, α 7nAChR, TNF α , Ocludina, ZO-1, Claudina 1 e 2. O sinal foi detectado por quimioluminescência com kit ECL da Amersham.

Para medir a permeabilidade intestinal, os camundongos foram submetidos ao jejum prévio de 12 horas e através de gavagem oral foi administrado 25 mg/100 g de peso corporal de isotiocianato de fluoresceína (FITC)-dextrano (Sigma-Aldrich) (ESHELMAN et al., 2019). Após 4 horas, os camundongos foram sacrificados e amostras de sangue serão rapidamente coletadas por decapitação e o soro isolado por centrifugação (3000rpm/15min). A concentração de FITC-dextrano foi medida em fluorômetro (BioTek, Synergy 2) (excitação, 485 nm e emissão, 528 nm).

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 9.0 (La Jolla, CA). Dados de distribuição normal foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados paramétricos foram analisados através de teste T de student não pareado ou ANOVA *two-way* seguido pós-teste de *Bonferroni*, de acordo com os grupos e fatores incidentes. Os dados considerados não paramétricos foram analisados através dos testes de *Mann-Whitney* ou *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn*. O nível de significância estatística foi mantido em 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Durante as quatro semanas de exposição das dietas, os animais foram pesados semanalmente até o dia da extração. O ganho de peso não foi diferente entre os grupos (**Fig. 2**). O comprimento do cólon foi significativamente diminuído no grupo HFD em comparação com o grupo controle (**Fig.2B e 2C**). Não houve diferença significativa na permeabilidade paracelular intestinal entre os grupos (**Fig.2D**). Assim, acreditamos que o consumo da HFD causa uma desordem das proteínas de junção, o que leva ao encurtamento do cólon. A literatura tem descrito que a HFD por 3 semanas induziu a atrofia do intestino delgado e do cólon, que continuou por duas semanas após o retorno da dieta controle (TANAKA 2020).

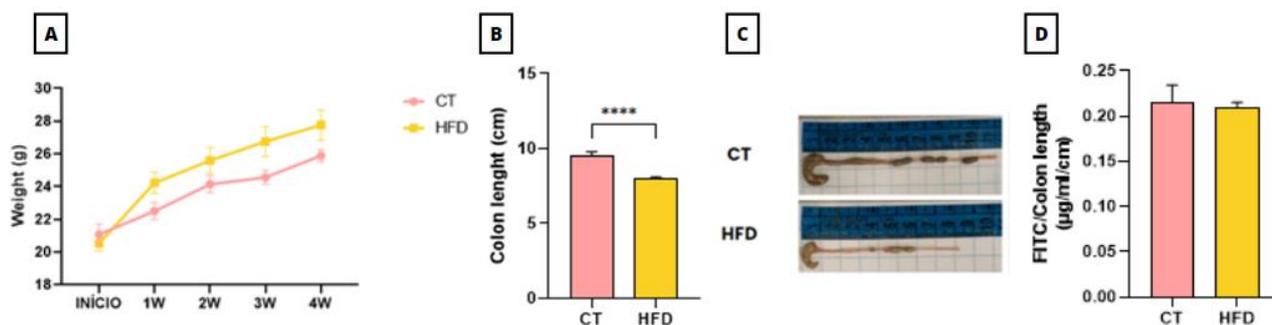


Fig.2 Evolução do peso, comprimento do cólon e permeabilidade paracelular intestinal de camundongos expostos às dietas controle e HFD durante 4 semanas. (A) Peso (g), (B) comprimento do cólon, (C) imagens representativas do cólon e (D) FITC pelo comprimento do cólon (ug/ml/cm). Os resultados estão em média \pm desvio padrão da média. Two way ANOVA e Teste t-student, **** $p < 0.0001$.

Ao realizar a análise da expressão gênica do IEC do cólon, o receptor $\alpha 7$ nAChR e as proteínas de junção Occludin e Tjp1 apresentaram uma redução significativa no grupo HFD comparado ao grupo controle (**Fig. 3ABC**), sem alteração das proteínas de junção Claudin 1 e Claudin 4 (**Fig.3DE**). A proteína TNF apresentou redução significativa entre os grupos (**Fig.3F**).

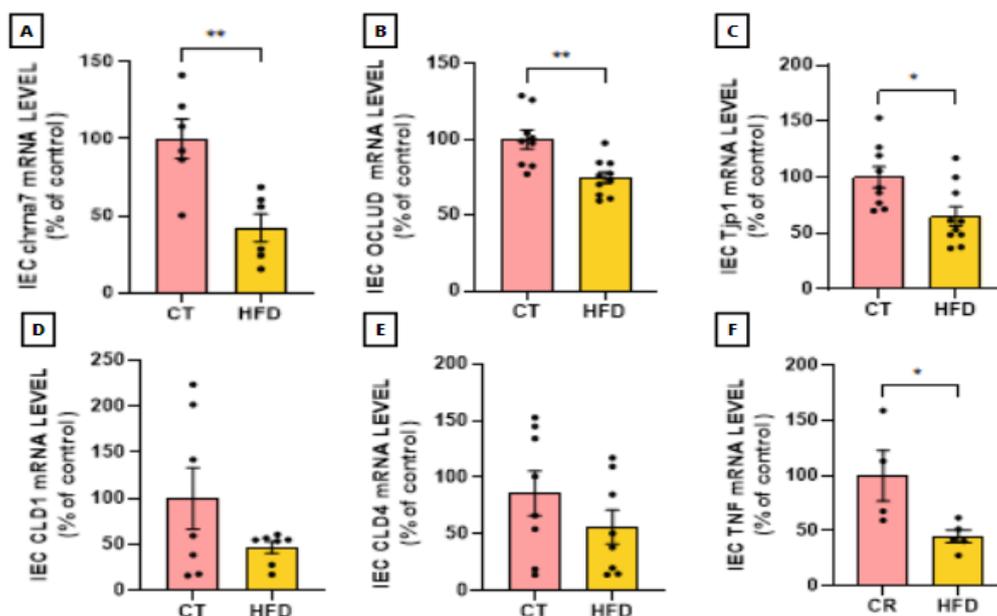


Fig.3 Análise da expressão gênica do receptor $\alpha 7$ nAChR e das proteínas de junção em camundongos expostos às dietas controle e hiperlipídica durante 4 semanas. (A) mRNA level (qRT-PCR) de Chrn7 no IEC do cólon, (B) mRNA level (qRT-PCR) de Occludin no IEC do cólon, (C) mRNA level (qRT-PCR) de Tjp1 no IEC do cólon, (D) mRNA level (qRT-PCR) de Claudin1 no IEC do cólon, (E) mRNA level (q RT-PCR) de Claudin 4 no IEC do cólon e (F) mRNA level (q RT-PCR) de TNF- α no IEC do cólon. Para análise da expressão gênica, ACTB foi usado como controle endógeno. Os resultados estão em média \pm erro padrão da média. Teste t-student, * $p \leq 0,05$, ** $p < 0.01$.

Na análise da expressão proteica no IEC do cólon, observamos diminuição significativa do receptor $\alpha 7$ nAChR, das proteínas de junção Claudina 1, Ocludina e Claudina 2 no grupo HFD quando comparado ao controle (**Fig.4A,BCD**). Apenas a proteína de junção ZO-1 não apresentou diferença significativa entre os grupos (Fig. 4E). Além disso, a proteína SIRT1 também apresentou redução significativa no grupo HFD comparado ao controle (**Fig. 4F**). Esses resultados sugerem que o consumo da HFD pode estar associado a danos na integridade da barreira intestinal. Estudos *in vitro* realizados com células CACO-2 mostraram que mediadores inflamatórios danificaram as proteínas de junção (AL-SADI et al. 2008; GUO et al. 2012; YE; MA; MA 2006). A ativação da SIRT1 tem sido associada a melhora do quadro inflamatório da colite, por inibir a ativação de NFkB (ZAGHLOUL; ELSHAL; ABDELMAGEED; 2022). A SIRT1 também é modulada pelo receptor $\alpha 7$ nAChR (LI et al. 2016), sugerindo que a redução de $\alpha 7$ nAChR possa estar associada à redução de SIRT1.

CONCLUSÕES:

Contudo, nossos resultados mostram que o consumo da HFD por quatro semanas reduz a expressão do receptor $\alpha 7$ nAChR, prejudica a expressão de proteínas de barreira e reduz o comprimento do cólon. Estes eventos podem estar associados a gravidade de doenças inflamatórias intestinais.

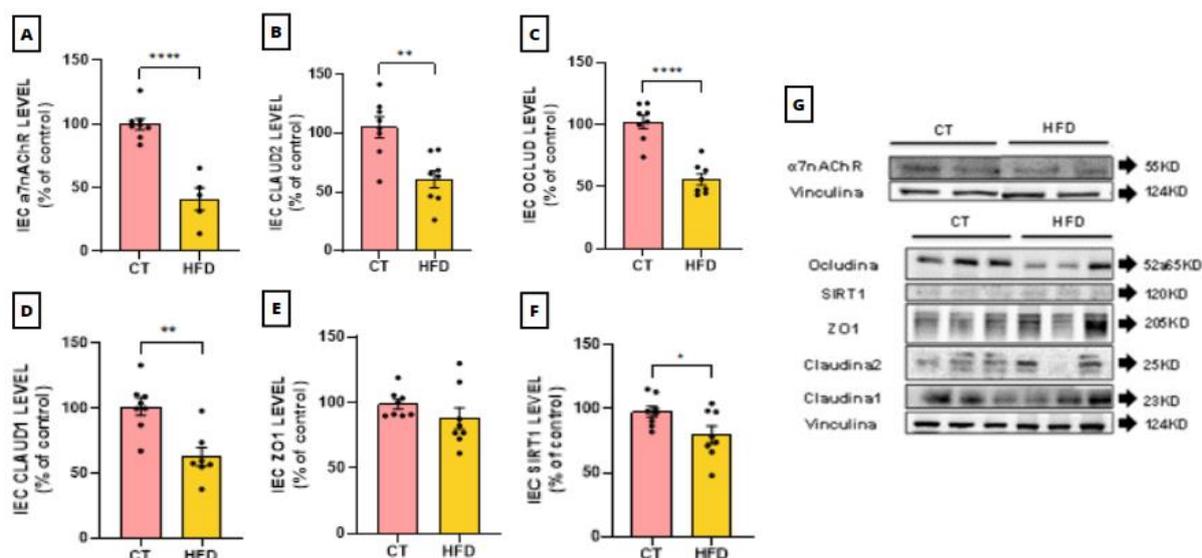


Fig. 4 Análise de expressão proteica em camundongos expostos a dietas controle e HFD durante 4 semanas. (A) $\alpha 7$ nAChR level no IEC do cólon, (B) Claudin 2 level no IEC do cólon, (C) Occludin level no IEC do cólon, (D) Claudin 1 level no IEC do cólon, (E) SIRT1 level no IEC do cólon, (F) ZO-1 level no IEC do cólon e (G) imagens representativas das bandas do Western Blotting. Os resultados estão em média \pm erro padrão da média. Teste t-student.

BIBLIOGRAFIA

- CANI, P. D., AMAR, J., IGLESIAS, M. A., POGGI, M., KNAUF, C., BASTELICA, D., NEYRINCK, A. M. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. July, p. 1761–1772, 2007.
- CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2- driven improvement of gut permeability. p. 1091–1103, 2009.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 6, p. 729–734, 2007.
- DI GIOVANGIULIO, M. et al. Vagotomy affects the development of oral tolerance and increases susceptibility to develop colitis independently of $\alpha 7$ nicotinic receptor. **Molecular Medicine**, v. 22, n. 8, p. 464–476, 2016.
- MATTEOLI, G. et al. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. **Gut**, v. 63, n. 6, p. 938–948, 2014.
- SOUZA, A. C. P. et al. Short-Term High-Fat Diet Consumption Reduces Hypothalamic Expression of the Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 7$ Subunit ($\alpha 7$ nAChR) and Affects the Anti-inflammatory Response in a Mouse Model of Sepsis. v. 10, n. March, p. 1–15, 2019.
- GENSER L., AGUANNO D., SOULA H.A., DONG L., TRYSTRAM L., ASSMANN K., SALEM J.E., VAILLANT J.C., OPPERT J.M., LAUGERETTE F., ET AL. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. **J. Pathol.**, v. 246, p. 217–230, 2018.
- SILICIANO, J. D.; MOOSEKER, M. S. Identification of ZO-1: A High Molecular Weight Polypeptide Associated with the Tight Junction (Zonula Occludens) in a Variety of Epithelia. v. 103, n. September, p. 35–37, 1986.
- AL-SADI, R. et al. Mechanism of IL-1 β -Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *The Journal of Immunology*, v. 180, n. 8, p. 5653–5661, 15 abr. 2008.
- GUO, M. et al. Role of Non-Muscle Myosin Light Chain Kinase in Neutrophil-Mediated Intestinal Barrier Dysfunction During Thermal Injury. *Shock*, v. 38, n. 4, p. 436–443, out. 2012.
- YE, D.; MA, I.; MA, T. Y. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 290, n. 3, p. G496–G504, mar. 2006.
- TANAKA, S. et al. High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 522, n. 4, p. 971–977, 2020.
- ZAGHLOUL, M. S.; ELSHAL, M.; ABDELMAGEED, M. E. Preventive empagliflozin activity on acute acetic acid-induced ulcerative colitis in rats via modulation of SIRT-1 / PI3K / AKT pathway and improving colon barrier. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 91, n. February, p. 103833, 2022.
- LI, D.-J. et al. $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Relieves Angiotensin II-Induced Senescence in Vascular Smooth Muscle Cells by Raising Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent SIRT1 Activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 36, n. 8, p. 1566–1576, ago. 2016.