



Avaliação do processo inflamatório no hipocampo de camundongos apoE KO^{-/-} alimentados com dietas contendo diferentes fontes de ácidos graxos.

Aluno: Julia Boro de Lima

Orientador: Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra

Palavras-Chave: Doença de Alzheimer; Apolipoproteína E; Ômega 3.

Autores: Julia Bôro de Lima; Letícia Maria Paula da Silva; Camila Venturini Ayres Cunha; Leandro Kansuke Oharomari; Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari; Adelino Sanchez Ramos da Silva; Eduardo Rochete Ropelle; José Rodrigo Pauli; Dennys Esper Corrêa Cintra; FCA – Unicamp

1. Introdução:

O déficit cognitivo associado à doença de Alzheimer (DA) apresenta característica de neurodegeneração, com caráter mais frequente associado à idade, fatores ambientais modificáveis, mas também a características genéticas. Trabalhos demonstram que a variante E4 da apolipoproteína E (apoE) é um importante fator genético associado à DA, uma vez que a apoE é uma proteína essencial ao transporte de colesterol, e um prejuízo em sua ação poderia culminar com o acúmulo da substância. O colesterol apresenta influência direta na gênese da doença por induzir acúmulo de proteína beta-Amiloide (bA), formadora das placas senis, característica primária da DA. Por outro lado, ácidos graxos ômega-3 (w3) podem interferir tanto na síntese endógena de colesterol quanto em processos inflamatórios. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a ação de uma dieta contendo ácidos graxos w3 sobre o processo inflamatório e deposição de proteína bA no hipocampo de camundongos apoE KO. Espera-se que a dieta hiperlipídica promova neuroinflamação e precipite prejuízos à memória e aprendizado, assim como a possibilidade da dieta contendo ômega-3 proteger do desenvolvimento dessas condições.

2. Materiais e métodos:

2.1 Animais Experimentais e Dietas: Foram utilizados 30 camundongos C57BL/6J apoE KO^{-/-}, com 4 semanas de vida, separados em 2 grupos. O primeiro grupo (N=10) foi alimentado com dieta comercial, e o segundo (N=20), com dieta hiperlipidemia (HF). Após 8 semanas, o grupo HF foi dividido em dois, onde um continuou recebendo dieta HF e outro (N=10) recebeu dieta hiperlipídica, substituída em 1/3 da banha por óleo de linhaça, rico em ômega 3 (FS – Flaxseed). Após outras quatro semanas, os animais foram eutanasiados para remoção dos materiais biológicos. Durante todo o período os animais receberam dieta e água ad libitum, tiveram seu consumo alimentar e peso corporal aferidos semanalmente. Figura 1 e 2.

2.2 Genotipagem: Para assegurar que o background genético dos camundongos apoE estivesse preservados como realmente heterozigotos para o gene apoE, um fragmento de 0,5 a 1 cm da cauda do animal foi coletada para teste de genotipagem. Foi utilizado o kit de extração e purificação de DNA redextract-n-amp tissue PCR kit. Sequencialmente as amostras foram submetidas à técnica de PCR

para análise da expressão gênica. Após corrida das amostras contendo primers específicos para identificação do gene apoE, realizou-se a leitura do gel de agarose no fotodocumentador UV. Figura 3.

2.2 Teste Comportamental – Morris Water Maze: Na última semana experimental, os animais foram submetidos ao teste comportamental Morris Water Maze. Durante 5 dias consecutivos, os animais foram colocados em tanque circular (2 m de diâmetro e 70 cm de profundidade) com água em temperatura controlada ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$). O teste consiste em observar os animais encontrarem a área de escape, que é uma plataforma submersa, em um dos quadrantes da piscina. Essa tarefa deve ser realizada pelo animal em até 60 segundos. Nos 4 primeiros dias, os animais foram submetidos pela fase de aquisição de memória espacial do escape, e no quinto dia, a plataforma foi retirada para avaliar quanto tempo o animal permanece no quadrante onde se encontrava o escape. Esse teste avalia o tempo em que os animais gastam até encontrarem o alvo, revelando assim o potencial de cada animal em se localizar, e também o caminho percorrido até a plataforma e a velocidade média de natação. Figura 4.

2.3 Perfil lipídico:

Para análise de triglicérides, HDL e colesterol total séricos, foram utilizados kits enzimáticos colorimétricos seguindo orientações do fabricante (LaborLab). Figuras 6, 7 e 8.

2.4 Western Blot:

O hipocampo foi homogeneizado com tampão de extração e posteriormente sua concentração protéica foi quantificada pelo método Bradford (1976). Em seguida foi realizada a eletroforese. As amostras serão incubadas em tampão Leammli a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos e posteriormente aplicadas em de gel de poliacrilamina (10 a 15%) para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas presentes no gel serão transferidas para membranas de nitrocelulose que foram incubadas em solução de leite em pó a 5%, por 1 hora e incubadas *overnight* com anticorpos primários das citocinas TNF-alpha e IL-1b e posteriormente com os respectivos anticorpos secundários. As bandas serão obtidas por meio de quimiluminescência e visualizadas em fotodocumentador. As bandas serão quantificadas utilizando o *software* UN-SCAN-IT gel 6.1. Figura (9,10 e 11)

2.5 Análise estatística:

Os resultados foram representados pela média \pm desvio padrão, após ANOVA oneway e ANOVA para medidas repetidas. Foi aplicado o teste T para WT vs CT e teste Bonferroni para HF vs CT, FS. foi adotado 0,05 como nível de significância.

3. Resultados

Durante o período experimental, os animais foram avaliados quanto à sua evolução ponderal. A figura 1 mostra a diferença obtida entre os grupos no que concerne ao ganho de peso.

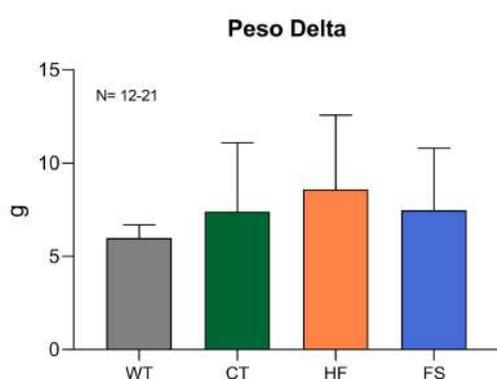


Figura 1: Delta do peso dos grupos experimentais. Diferença entre o peso inicial e final (delta) entre os grupos, resultados expressos em gramas. WT vs CT por teste T; HF vs CT, FS por Bonferroni.

O consumo calórico dos animais foi avaliado a partir do consumo diário em gramas da dieta, considerando as quilocalorias de cada dieta, sendo WT e CT 3,37 kcal/g e HF e FS 5,43 kcal/g. Não havendo diferença estatística entre os grupos, como demonstra a figura 2.

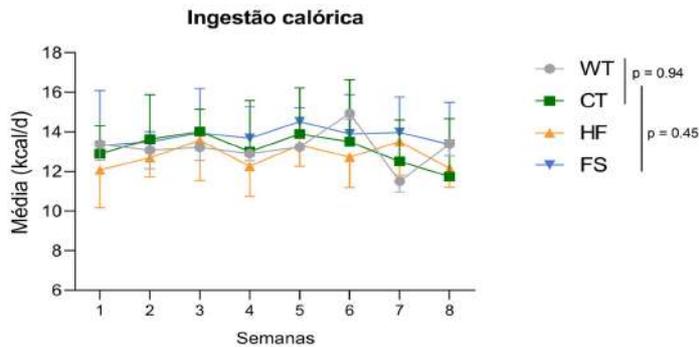


Figura 2: Ingestão calórica diária. WT e CT = 3,37 kcal/g; HF e FS = 5,43 kcal/g. WT vs CT por teste T; HF vs CT, FS por Bonferroni.

A genotipagem revelou que os animais experimentais eram apoE KO^{-/-}, Figura 3.

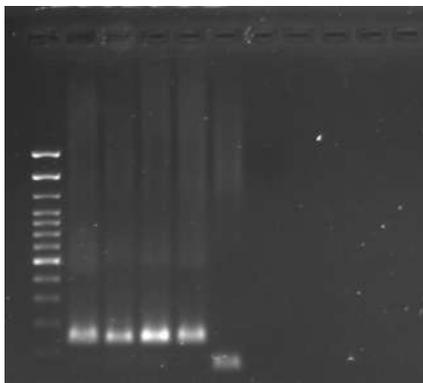


Figura 3: O primeiro poço evidencia o marcador de peso molecular. Nos três poços sequenciais, se encontram as amostras aleatorizadas de 03 dos animais experimentais. O quarto poço trata-se de um controle positivo para o gene da apoE^{-/-}, e o último poço se refere a um animal selvagem. O resultado confirma que todos os animais experimentais estão negativados para o gene apoE.

No teste para avaliação da memória e aprendizado espacial, a figura 4 contém o resultado parcial do período de aquisição nos 4 primeiros dias. Foi observado que, comparado com os grupos ApoE KO^{-/-} (CT, HF e FS), o grupo selvagem (WT) demonstrou melhor capacidade cognitiva ao encontrar a plataforma de escape em menor período de tempo.

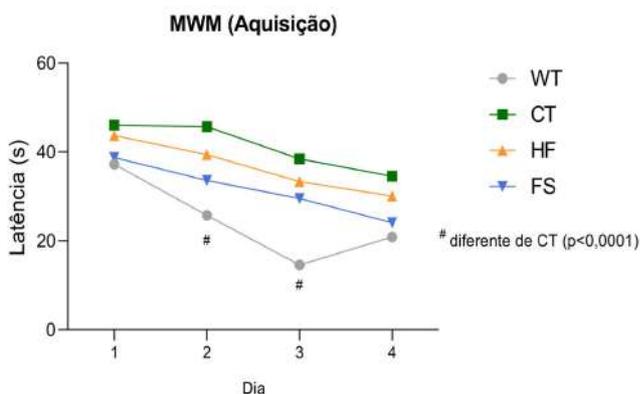


Figura 4: Período de aquisição expresso em latência de escape em segundos para os 4 dias de teste. No segundo e terceiro dia houve diferença entre WT vs CT ($P < 0,0001$) por teste T; HF vs CT, FS por Bonferroni.

Para o perfil lipídico, foram realizados testes de quantificação de colesterol total, triglicérides, e HDL. Os animais ApoE possuem maiores concentrações séricas de colesterol total, e menores concentrações de

HDL, quando comparados ao grupo WT, mostrados nas figuras 5 e 6. Já para análise de triglicérides, figura 8, o grupo HF é o de maior concentração, estatisticamente.

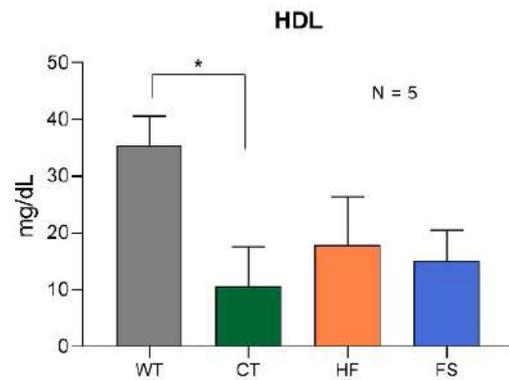
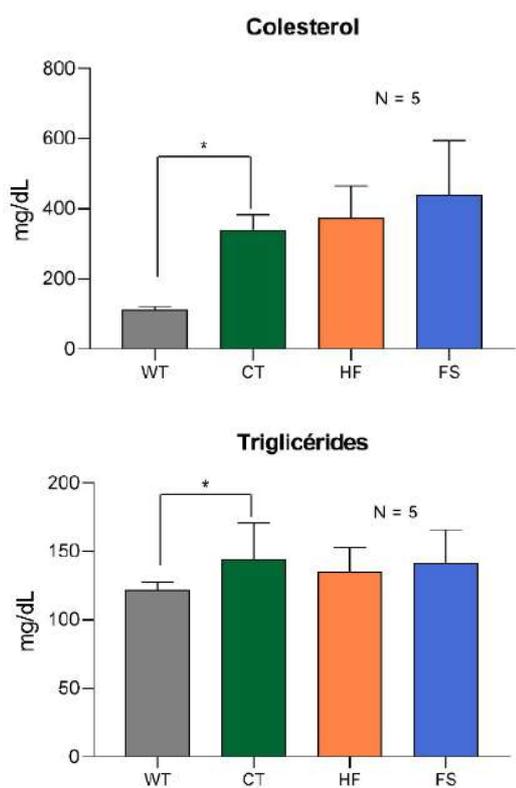


Figura 5: Avaliação dos níveis séricos de colesterol total. Diferença entre WT vs CT ($P < 0,0001$) por teste T; HF vs CT, FS por Bonferroni. **Figura 6:** Avaliação dos níveis séricos de HDL. Diferença entre WT vs CT ($P < 0,05$) por teste T; HF vs CT, FS por Bonferroni. **Figura 7:** Avaliação dos níveis séricos de triglicérides. Diferença entre WT vs CT ($P < 0,05$) por teste T; HF vs CT, FS por Bonferroni..

Nas análises de Western Blot, beta-actina foi utilizada como endógeno, e as citocinas inflamatórias IL1-beta e TNF-alfa foram mensuradas, como mostra as figuras 9, 10 e 11. Em WT vs CT, houve diferença estatística na quantificação de TNF-alfa, figura 8.

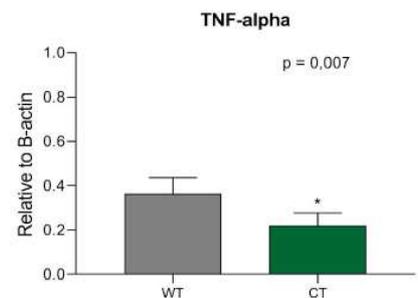
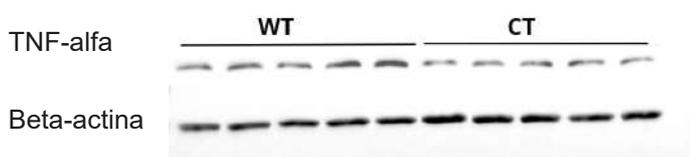


Figura 8: Quantificação de TNF-alfa por Western Blot. Diferença entre WT ($n = 5$) vs CT ($n = 5$) ($P < 0,007$) por teste T.

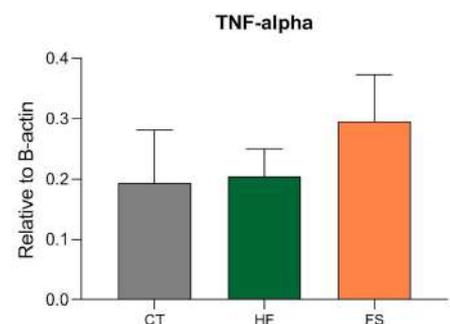
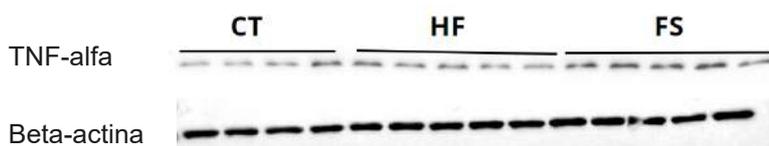


Figura 9: Quantificação de TNF-alfa por Western Blot. HF ($n = 5$) vs CT ($n = 4$), FS($n = 5$) por Bonferroni.

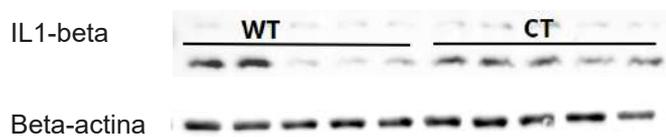


Figura 10: Quantificação de IL1-beta por Western Blot. WT (n = 5) vs CT (n = 5) por teste T.

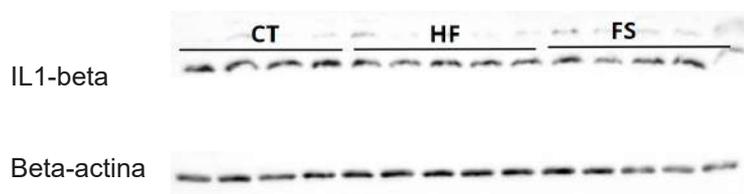
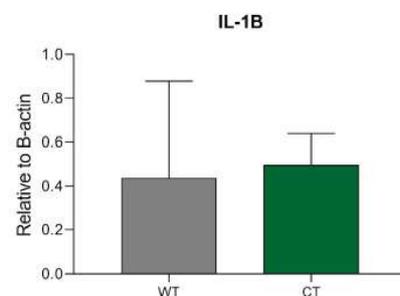
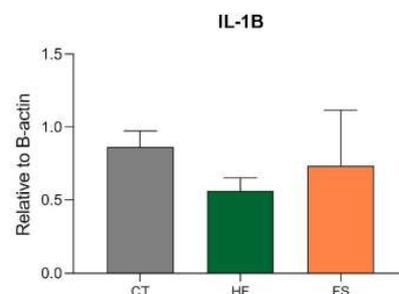


Figura 11: Quantificação de IL1-beta por Western Blot. HF (n = 5) vs CT (n = 4), FS (n = 5) por Bonferroni.



4. Conclusão:

O background genético dos animais apoE KO ^{-/-} pode causar alterações em suas características fisiológicas, visto os presentes resultados que demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos WT e CT ao se analisar o perfil lipídico e o período de aquisição de memória espacial. A dieta HF não demonstrou neuroinflamação e piora da memória espacial, tão pouco a dieta FS foi capaz de converter as alterações fisiológicas advindas do gene apoE. Sendo assim, a característica genética que leva a supressão da apolipoproteína E, pode se apresentar superior ao tratamento nutricional, no que tange a suplementação com ômega 3 em camundongos obesos.

5. Referências:

1. Araya-Quintanilla F, Gutiérrez-Espinoza H, Sánchez-Montoya U, Muñoz-Yañez MJ, Baeza-Vergara A, Petersen-Yanjarí M, Fernández-Lecaros L. Effectiveness of omega-3 fatty acid supplementation in patients with Alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurologia (Engl Ed)*. 2020 Mar;35(2):105-114. English, Spanish.
2. Prado, D., & Cardoso, I. L. (2013). Apolipoproteína E e Doença de Alzheimer. *Revista Neurociências*, 21(1), 118–125.
3. Backes J, Anzalone D, Hilleman D, Catini J. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis*. 2016 Jul 22;15(1):118.
4. SASE A.; DAHANAYAKA S. HÖGER H.; WU G.; LUBEC G. Changes of hippocampal beta-alanine and citrulline levels are paralleling early and late phase of retrieval in the Morris Water Maze. *Behavioral Brain Research*, v. 249, p. 104-108., 2013.