



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia

Jaqueline de Souza Felipe

**Análise do efeito da ingestão alimentar e produção intestinal
de ácidos graxos de cadeia curta sobre a expressão de genes
alvos de HIF-1 em células epiteliais intestinais**

**Analysis of the effect of food intake and intestinal production
of short-chain fatty acids on the expression of HIF-1 target
genes in intestinal epithelial cells**

Campinas
2020

Jaqueline de Souza Felipe

Análise do efeito da ingestão alimentar e produção intestinal de ácidos graxos de cadeia curta sobre a expressão de genes alvos de HIF-1 em células epiteliais intestinais

Analysis of the effect of food intake and intestinal production of short-chain fatty acids on the expression of HIF-1 target genes in intestinal epithelial cells

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na Área de Imunologia.

Dissertation presented to the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology at the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master's Degree in Genetics and Molecular Biology in the Immunology Area.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurelio Ramirez Vinolo

Este trabalho corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna JAQUELINE DE SOUZA FELIPE e orientada pelo Prof. Dr. MARCO AURELIO RAMIREZ VINOLO

Campinas
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F335a Felipe, Jaqueline de Souza, 1993-
Análise do efeito da ingestão alimentar e produção intestinal de ácidos graxos de cadeia curta sobre a expressão de genes alvos de HIF-1 em células epiteliais intestinais / Jaqueline de Souza Felipe. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Marco Aurélio Ramirez Vinolo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ácidos graxos de cadeia curta. 2. Células epiteliais. 3. Mucosa intestinal. 4. Subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia. I. Vinolo, Marco Aurélio Ramirez, 1982-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of the effect of food intake and intestinal production of short-chain fatty acids on the expression of HIF-1 target genes in intestinal epithelial cells

Palavras-chave em inglês:

Short chain fatty acids

Epithelial cells

Intestinal mucosa

Hypoxia-inducible factor 1, Alpha subunit

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marco Aurélio Ramirez Vinolo [Orientador]

Angelica Thomaz Vieira

Marcelo Alves da Silva Mori

Data de defesa: 14-08-2020

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9595-0337>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7900848951064739>

Campinas, 14 de Agosto de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Aurelio Ramirez Vinolo

Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori

Prof.^a Dr.^a Angelica Thomaz Vieira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedicatória

Dedico a minha mãe e ao meu pai, Eliane e Evaldir, e a minha irmã, Mariane, por serem meus principais incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Marco Aurelio, por ter aberto as portas de seu laboratório e compartilhado seu apreço pela ciência e conhecimento. Agradeço, também, a sua paciência, incentivo e conselhos ao longo do caminho.

Aos meus amigos, o mais sincero obrigada pelos momentos felizes que tornaram os dias difíceis em dias mais maleáveis, principalmente aos amigos que fiz no L2: obrigada por todo carinho e aprendizagem compartilhada. Sem vocês esse processo não teria sido o mesmo. Estendo os meus agradecimentos a todos os amigos que fiz no Programa de Pós Graduação: vocês tornaram minhas experiências inesquecíveis.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Genética, Evolução e Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas por toda a infraestrutura e disponibilidade ao longo desta trajetória. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A função de barreira das células epiteliais intestinais (IECs) é influenciada pelos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), produtos do metabolismo da microbiota intestinal. Esses compostos regulam o consumo de oxigênio das IECs, promovendo hipóxia tecidual e consequente ativação do fator induzível por hipóxia (HIF). Nesse contexto, trabalhamos com a hipótese de que, com disponibilidade reduzida de ácidos graxos de cadeia curta, haveria diminuição na estabilização de HIF-1 α e, conseqüentemente, da função da barreira epitelial. Nesse estudo utilizamos o modelo experimental de jejum/realimentação; com isso, primeiramente reduzimos a disponibilidade de AGCCs e observamos um aumento gradual desses metabólitos quando os animais foram realimentados, sendo que, a partir de 8 horas, houve aumento significativo de butirato. A seguir, avaliamos se a estabilidade de HIF-1 α após a ingestão alimentar poderia ser mediada pelos AGCCs – para isso, usamos camundongos ODD-luciferase. Os testes *in vivo* feitos com imageamento mostraram aumento na luminescência abdominal, e o ensaio de luciferase em amostras do cólon evidenciou a estabilidade de HIF-1 α em animais realimentados. Com a restauração na disponibilidade de AGCCs no epitélio intestinal, mostramos que houve diferença na estabilização da proteína HIF-1 α no cólon de animais em diferentes períodos de realimentação. Após administração oral de tributirina, uma pró-droga de butirato, os nossos dados mostraram que a estabilização de HIF-1 α pode ser mediada via butirato, com efeitos a partir de 4 horas e mais evidente com 8 horas de administração. De forma complementar a esses dados, observamos que houve aumento de HIF-1 α nas IECs, com evidência no grupo de animais realimentados por 8 horas. Desta forma, também houve modulação dos genes alvos de HIF-1 como *Muc2*, *Tff3*, *Pfkfb3*, *Vegf* e *Cldn1*. Associado a isto, analisamos a interação das IECs com os componentes da microbiota intestinal, e nossos resultados demonstraram que o efeito pode ser dependente de HIF-1 α . Utilizamos animais knockout tecido específico para HIF-1 α (VilCre⁺HIF-1), que apresentaram um aumento na carga bacteriana no muco quando comparados com animais *wildtype* (VilCre⁻HIF-1) depois de 8 horas de realimentação. Em conjunto, nossos dados apontaram uma possível contribuição dos AGCCs para a estabilização de HIF-1 α e expressão de seus genes alvos no epitélio intestinal no contexto da realimentação, o que pode modular a função de barreira. Complementando, a ausência de HIF-1 α provavelmente impacta a interação entre IECs e a microbiota intestinal.

Palavras-chave: Ácidos graxos de cadeia curta, células epiteliais intestinais, HIF-1 α

ABSTRACT

The barrier function of IECs can be influenced by the action of short-chain fatty acids (SCFAs), products of the metabolism of the intestinal microbiota. These compounds regulate the oxygen consumption of IECs, promoting tissue hypoxia and consequent activation of the hypoxia-inducible factor (HIF). In this context, we work with the hypothesis that with reduced availability of short-chain fatty acids, there would be a decreased stabilization of HIF-1 α and consequently damage to the epithelial barrier. In this study we used the experimental model of amento daeeding, so we first reduced the availability of AGCCs and observed a gradual increase in these metabolites when the animals were fed, and after 8 hours there was a significant increase in butyrate. Next, we assessed whether the stability of HIF-1 α , after food intake could be mediated by the SCFAs. For this we used an ODD-luciferase. *In vivo* tests performed with imaging showed an increased abdominal luminescence and luciferase assay in the colon samples showed stability of HIF-1 α in refed mice. With the restoration in the availability of SCFAs in the intestinal epithelium, we showed that there was a difference in the stabilization of the HIF-1 α protein in the colon in mice in different periods of refeeding. After oral administration of tributyrin, a prodrug of butyrate, our data showed that stabilization of HIF-1 α can be mediated via butyrate, with effects from 4 hours and more evident with 8 hours of administration. In addition to these data, we observed that there was an increase in HIF-1 α in IECs, with evidence in the group of animals fed back for 8 hours. Thus, there was also modulation of the target genes with increased expression of the *Muc2*, *Tff3*, *Pfkfb3*, *Vegf* and *Cldn1* genes, which are responsible for mucus production and viscosity, glycolytic metabolism, angiogenesis and junction components between intestinal epithelial cells, respectively. Associated with this, we analyzed the interaction of IECs with the components of the intestinal microbiota and our results demonstrated that the effect may be dependent on HIF-1 α . We used tissue-specific mice knockout for HIF-1 α (VilCre + HIF-1) that showed an increase in bacterial load within the mucus when compared with widtype mice (VilCre-HIF-1) after 8 hours of refeeding. Together, our data pointed to a possible contribution of SCFAs to the stabilization of HIF-1 α and expression of its target genes in the intestinal epithelium in the context of refeeding, which can modulate the barrier function. In addition, the absence of HIF-1 α probably impacts the interaction between IECs and the intestinal microbiota.

Keywords: Short-chain fatty acids, intestinal epithelial cells, HIF-1 α

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ilustração da estrutura intestinal.....	13
Figura 2. Consumo de oxigênio pelas células epiteliais intestinais.....	15
Figura 3. Esquema da hipótese do projeto.....	17
Figura 4. Protocolo experimental utilizado no projeto.....	18
Figura 5. Esquema do animal transgênico ODD-luciferase.....	19
Figura 6. Quantificação total dos AGCCs no conteúdo luminal de animais ODD-luciferase.....	25
Figura 7. Quantificação individual dos AGCCs no conteúdo luminal de animais ODD-luciferase.....	25
Figura 8. Detecção de bioluminescência total em animais ODD-luciferase.....	27
Figura 9. Análise da estabilização de HIF-1 α	27
Figura 10. Marcação de HIF-1 α nas IECs do cólon por citometria de fluxo.....	28
Figura 11. Análise do gene <i>Hif1a</i> em IECs de camundongos após ingestão alimentar.....	29
Figura 12. Análise de genes-alvo de HIF-1 em células epiteliais intestinais.....	29
Figura 13. Análise da estabilização de HIF-1 em camundongos tratados com tributirina.....	30
Figura 14. Análise das células mielóides no epitélio intestinal por citometria de fluxo.....	31
Figura 15. Proliferação das IECs do cólon por EdU.....	32
Figura 13. Análise da carga bacteriana por qPCR.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCCs - ácidos graxos de cadeia curta

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

HIF - Fator Induzível por Hipóxia (do inglês hypoxia-inducible factor).

IECs - Células Epiteliais Intestinais (do inglês Intestinal epithelial cells)

ODD - Domínio de Degradação de Oxigênio (do inglês *oxygen degradable domain*)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Animais utilizados	17
3.2 Condições dos grupos experimentais	18
3.3 Análise atividade de HIF <i>in vivo</i> - IVIS Spectrum	19
3.4 Extração de proteínas para análise de atividade de luciferase	19
3.5 Quantificação de luciferase em tecidos homogeneizados	20
3.6 Quantificação de ácido graxo de cadeia curta	20
3.7 Genes-alvo de HIF	20
3.8 Análise da microbiota associada à mucosa	22
3.9 qPCR carga bacteriana	22
3.10 Curva padrão <i>E. coli</i> para análise da carga bacteriana	22
3.11 Extração das células da lâmina própria	22
3.12 Marcação dos leucócitos	23
3.13 Tratamento com tributirina	24
4. RESULTADOS	24
4.1 A ingestão alimentar altera a produção dos ácidos graxos de cadeia curta no intestino	24
4.2 A ingestão alimentar altera a estabilidade de HIF-1 α nas IECs do cólon	26
4.3 A ingestão alimentar altera a expressão de HIF-1 α e seus alvos nas IECs do cólon	28
4.4 A estabilização de HIF-1 α observada após ingestão alimentar pode ser mediada por ácidos graxos de cadeia curta	30
4.5 A ingestão alimentar tem pouca influência na presença de células inflamatórias na lâmina própria	30
4.6 A ingestão alimentar aumenta a proliferação de IECs	31
4.7 A ingestão alimentar modifica a interação das IECs com os componentes da microbiota intestinal, efeito esse que parece ser dependente de HIF-1 α	32
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	37
7. REFERÊNCIAS	38
ANEXO I – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – Adendo	42
ANEXO II – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	43
ANEXO III – Declaração de direitos autorais	44

1. INTRODUÇÃO

O epitélio intestinal está em contato diariamente com uma vasta quantidade de produtos que variam desde os componentes da dieta a uma grande comunidade microbiana que habita, de forma simbiótica, o intestino. A sua estrutura é formada por células epiteliais – que, além de funções absorptivas, são produtoras de hormônios, muco e de peptídeos antimicrobianos – e por células imunológicas, caracterizando uma organização altamente especializada e localizada estrategicamente ao longo do trato gastrointestinal. A atuação sinérgica desse conjunto de células mantém a integridade de barreira, garantindo a absorção de nutrientes e o monitoramento de microrganismos potencialmente patogênicos. O epitélio intestinal é um componente importante da imunidade inata, pois é nele que ocorre o início da sinalização para células imunológicas promoverem uma resposta imune eficaz (Allaire *et al.*, 2018; Branca *et al.*, 2019).

A organização em uma camada única de células epiteliais intestinais (IECs) difere no intestino delgado e no cólon em relação à estrutura e à composição celular. O epitélio intestinal varia de acordo com as diferentes regiões do intestino caracterizadas por seus requisitos funcionais distintos. No intestino delgado, o epitélio se estende através de vilosidades voltadas para o lúmen, aumentando a superfície de contato; em contrapartida, as vilosidades estão ausentes no cólon. Em geral, a maioria dos tipos de células localizados no cólon também são encontrados no intestino delgado, que incluem os enterócitos, células enteroendócrinas, células caliciformes e as *tuft cell*, responsáveis pela absorção, secreção de hormônios, de muco e defesa contra helmintos, respectivamente. Contudo, alguns tipos de células são predominantes no intestino delgado, como as células de Paneth, responsáveis pela liberação de fatores antimicrobianos e pela sustentação do nicho de células tronco e células M, que contribuem para a captação e o transporte de antígenos para a apresentação ao sistema imunológico (Fig.1) (Allaire *et al.*, 2018).

As células em locais de barreira são constantemente expostas a elementos microbianos que podem comprometer a função do tecido, seja por danificar diretamente as células ou por ativação excessiva de processos inflamatórios (Nowarski, Jackson, Flavell, 2017). Uma camada de IECs segrega o meio interno do conteúdo presente no lúmen intestinal. Esse sistema de barreira epitelial é especialmente adaptado para lidar com colonização por bactérias comensais que auxiliam na digestão dos alimentos, além de proteger o hospedeiro de infecções e da exposição contínua a estímulos potencialmente inflamatórios, coordenando respostas apropriadas, variando de tolerância imunológica a uma resposta a patógenos. A função de barreira do epitélio é

proporcionada pelas IECs e por complexos juncionais intercelulares que selam o espaço paracelular (Peterson, Artis, 2014; Blander *et al.*, 2017; Kurashima, Kiyono, 2017).

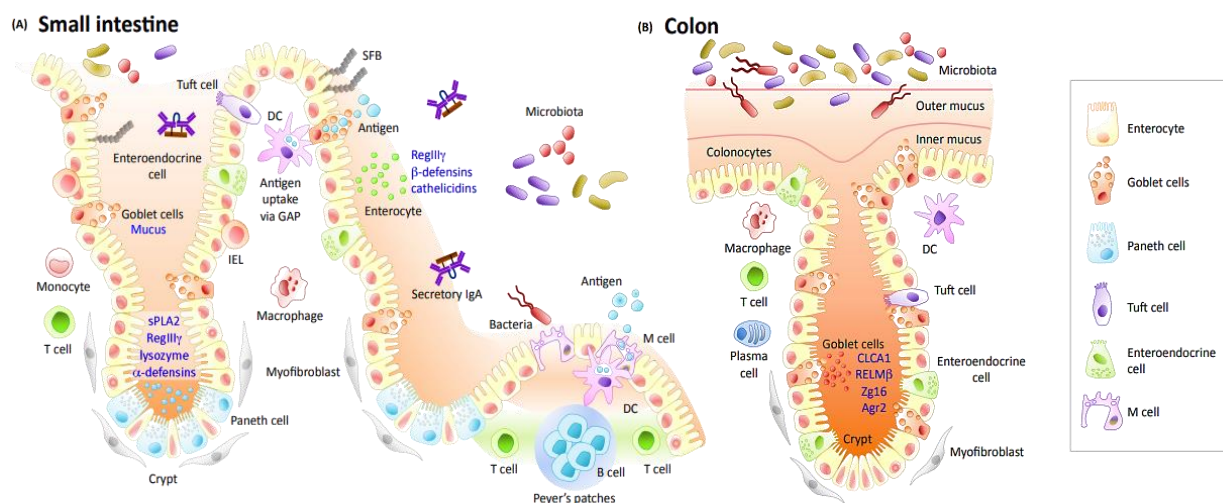


Figura 1. Ilustração da estrutura intestinal. (A) Representação das células epiteliais intestinais presentes no intestino delgado. Os enterócitos são os principais tipos celulares presentes: além de serem responsáveis pela absorção de nutrientes, secretam alguns peptídeos antimicrobianos. As células de Paneth, localizadas na base da cripta, secretam peptídeos antimicrobianos específicos, como: lisozima, alfa-defensina e sPLA2. As células M estão localizadas no epitélio associado ao folículo e são responsáveis pela captação de antígenos. (B) Representação das células epiteliais intestinais presentes no cólon. Os colonócitos e as células caliciformes são os tipos celulares predominantes no cólon. As células caliciformes são responsáveis pela formação da camada de muco. Imagem publicada por Allaire *et al.*, **Trends Immunol**, 2018.

A microbiota intestinal é composta por um grupo amplo, heterogêneo e dinâmico de micro-organismos (bactérias, vírus, fungos e protozoários) que colonizam, temporária ou permanentemente, as superfícies do trato gastrointestinal (Branca *et al.*, 2019). Diversos estudos têm demonstrado que a microbiota é extremamente importante para a homeostase do hospedeiro, contribuindo para diferentes funções fisiológicas, incluindo absorção de nutrientes e metabolismo, desenvolvimento e ativação do sistema imunológico e proteção contra agentes patogênicos (Hooper *et al.*, 2002; Maynard *et al.*, 2012; Brestoff *et al.*, 2013; Purchiaroni *et al.*, 2013; Sommer *et al.* 2013). Nesse sentido, alterações da microbiota intestinal (disbiose) estão envolvidas no desenvolvimento de muitas patologias, incluindo a doença inflamatória intestinal, a asma, a obesidade, entre outras (Brestoff *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2014; Trompette *et al.*, 2014).

A investigação dos mecanismos envolvidos na comunicação entre microbiota e as células do hospedeiro é um campo de pesquisa que vem sendo aprofundado nos últimos anos. Dentro desse contexto, sabe-se que a geração e liberação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) no lúmen intestinal têm papel relevante, pois são metabólitos importantes produzidos no processo de fermentação bacteriana e estão presentes em altas concentrações (milimolar) no intestino, sendo

os mais abundantes acetato, propionato e butirato (Cummings *et al.*, 1987; Corrêa *et al.*, 2016, Allaire *et al.*, 2018; Branca *et al.*, 2019).

Os AGCCs são utilizados como substrato energético por diferentes espécies bacterianas e também são captados e absorvidos pelas IECs (por via passiva e ativa, envolvendo transportadores como o Slc5a8), nas quais exercem funções relevantes para a fisiologia do epitélio intestinal. Trabalhos recentes têm mostrado que os AGCCs atuam sobre as células epiteliais intestinais, regulando diferentes aspectos funcionais dessas células, incluindo sua função de barreira, produção de hormônios enteroendócrinos, citocinas e peptídeos antimicrobianos, além da modulação da proliferação e apoptose de células que compõem o epitélio intestinal (Corrêa *et al.*, 2016; Chen, Vitetta, 2018; Schulthess *et al.*, 2019).

Atualmente, sabe-se que esses compostos, principalmente o butirato, constituem fonte essencial de energia para as células epiteliais intestinais. Nesse sentido, diversos estudos têm mostrado que essas células utilizam butirato preferencialmente em relação a outras moléculas, como glutamina e glicose, na geração de energia, e a ausência ou redução das concentrações luminais desse produto bacteriano desencadeiam alterações importantes como indução de autofagia (Roediger, 1982; Ahmad *et al.*, 2000; Donohoe *et al.*, 2011; Allaire *et al.*, 2018).

As concentrações de AGCCs podem ser alteradas de acordo com a composição da microbiota intestinal, que influencia a capacidade das bactérias em fermentar carboidratos e fibras não digeríveis e também é dependente da dieta. A microbiota intestinal desempenha um papel relevante no metabolismo energético das células (Cani *et al.* 2019). Oscilações diurnas na composição e nas suas funções são controladas pelo momento da ingestão de alimentos e pela composição da dieta. A interação diurna entre o hospedeiro e sua microbiota intestinal pode afetar a atividade de tecidos e é particularmente crítica para a homeostase metabólica do hospedeiro (Thaiss *et al.*, 2016).

Com isso, fica clara a influência da dieta na microbiota e na saúde do hospedeiro. Estudos com restrição alimentar indicam uma série de alterações que afetam o metabolismo energético e a proliferação celular. Higashizono *et al.*, 2018 demonstram em seu estudo a influência do jejum por 24 horas na morfologia intestinal. Os pesquisadores apontam diminuição na altura das vilosidades e na profundidade das criptas intestinais, assim como uma diminuição nos linfócitos da lâmina própria e do espaço intraepitelial. Tais alterações representam uma mudança importante na morfologia intestinal, influenciando a função da barreira intestinal, tornando-a vulnerável a danos. Este estudo, como a maioria dos outros estudos, analisou especificamente o intestino delgado. Contudo, pouco se sabe sobre esse impacto no cólon, local de maior produção dos AGCCs.

Os AGCCs regulam o metabolismo energético das células epiteliais, contribuindo para o consumo de oxigênio, o que promove hipóxia tecidual e consequente ativação do fator induzível pela hipóxia (HIF) (Kelly *et al.*, 2015). Os colonócitos na região apical das criptas metabolizam o butirato como fonte de energia através da β -oxidação, consumindo o oxigênio local (O_2) oriundo dos vasos sanguíneos subjacentes. Esse processo forma um gradiente de butirato-oxigênio inversamente proporcional, garantindo um microambiente luminal anaeróbico rico em butirato, enquanto a base da cripta permanece rica em oxigênio (Fig. 2) (Allaire *et al.*, 2018). No intestino, a tensão de oxigênio é normalmente baixa (variando de 8% a 1%) (Colgan *et al.*, 2016; Zeitouni *et al.*, 2016), estando as células epiteliais em estado de "hipóxia fisiológica" (Taylor, Colgan, 2017).

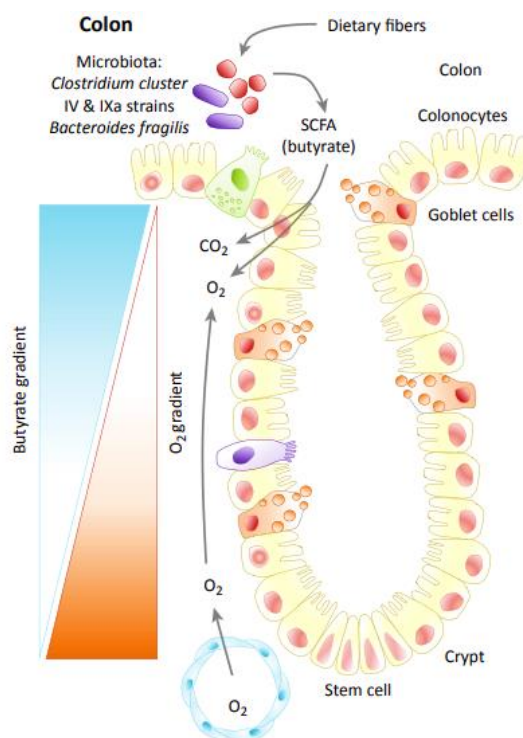


Figura 2. Consumo de oxigênio pelas células epiteliais intestinais. Há a formação de um gradiente de concentração de butirato e oxigênio no cólon. Micro-organismos comensais, como as bactérias do gêneros *Clostridia* e *Bacteroides*, consomem as fibras alimentares e são as principais produtoras de butirato. O colonócitos na região apical da cripta utilizam o butirato como substrato energético e consomem o oxigênio local oriundo dos vasos sanguíneos subjacentes. Desse modo, forma-se um gradiente inversamente proporcional de butirato e oxigênio, sendo a região luminal mais rica em butirato e a base da cripta rica em oxigênio. Imagem modificada de Allaire *et al.*, **Trends Immunol**, 2018.

Esse microambiente hipóxico e a consequente ativação de sensores de hipóxia é crucial para a função da mucosa intestinal, tanto em condição fisiológica quanto durante processos patológicos, como na inflamação intestinal (Glover *et al.*, 2016; Taylor, Colgan, 2017). O HIF é um dos principais mecanismos pelos quais as células monitoram e respondem a redução da tensão de O_2 . Este fator de transcrição é formado por duas subunidades: HIF-1 β , que é constantemente expressa, e HIF- α , que tem três isoformas: 1 α , 2 α e 3 α , sendo a primeira a mais estudada e cuja

estabilidade é regulada por enzimas prolil-hidroxilases. Resumidamente, em condições normais de O₂, essas enzimas são ativadas e hidroxilam a subunidade alfa de HIF, que permite sua interação com a proteína supressora de tumores von Hippel-Lindau (VHL), responsável pela ubiquitinação HIF- α , contribuindo para sua degradação via proteassoma (Kelly et al., 2013).

Em hipóxia, esses mecanismos são inibidos, o que faz com que a subunidade alfa de HIF se acumule na célula e, juntamente com outras proteínas, desencadeie a expressão de diversos genes relevantes para a adaptação celular à condição de baixa disponibilidade de oxigênio (Semenza, 2004). Dentre esses, vale ressaltar genes associados ao metabolismo e à função de barreira, incluindo componentes da via glicolítica (Xue, Ramakrishnan, Shah, 2014), genes envolvidos na produção de muco como, por exemplo, o da mucina-3 (Louis *et al.*, 2006), interações entre células como as claudinas (Saeedi *et al.*, 2015) e defesa (peptídeos antimicrobianos, como defensinas e catelicidinas) (Kelly *et al.*, 2013).

A estabilização de HIF-1 α pelo butirato é relevante para a barreira epitelial no cólon em condição homeostática e durante condições patológicas. Essa interação possui papel importante na regulação da integridade da barreira epitelial através da regulação coordenada de proteínas de junção (Morrison & Preston, 2016). A estabilização epitelial do HIF-1 α está ligada à barreira epitelial por meio dos seus genes alvos, sendo importantes componentes para a homeostase intestinal. De acordo com trabalho recente do nosso grupo, em um contexto de disbiose intestinal e infecção induzida por *Clostridioides difficile*, a ativação do fator de transcrição HIF-1 é um mecanismo relevante e com atuação importante na resistência à infecção intestinal. Dentro desse cenário, o butirato exerce um papel protetor nas células epiteliais intestinais contra os danos causados pelas toxinas de *C. difficile* por meio da estabilização de HIF-1 α , atenuando a resposta inflamatória local e suas consequências sistêmicas (Fachi *et al.*, 2019).

Tendo em vista o exposto, analisamos como a ingestão alimentar, após um período de jejum, poderia afetar o epitélio intestinal. Nossa hipótese é que, com a ingestão alimentar e o processamento das fibras alimentares, haja aumento da disponibilidade de ácidos graxos de cadeia curta e, consequentemente, estabilização de HIF-1 α e modulação de seus genes alvos, o que contribuiria para a função de barreira, conforme ilustrado pela figura 3.

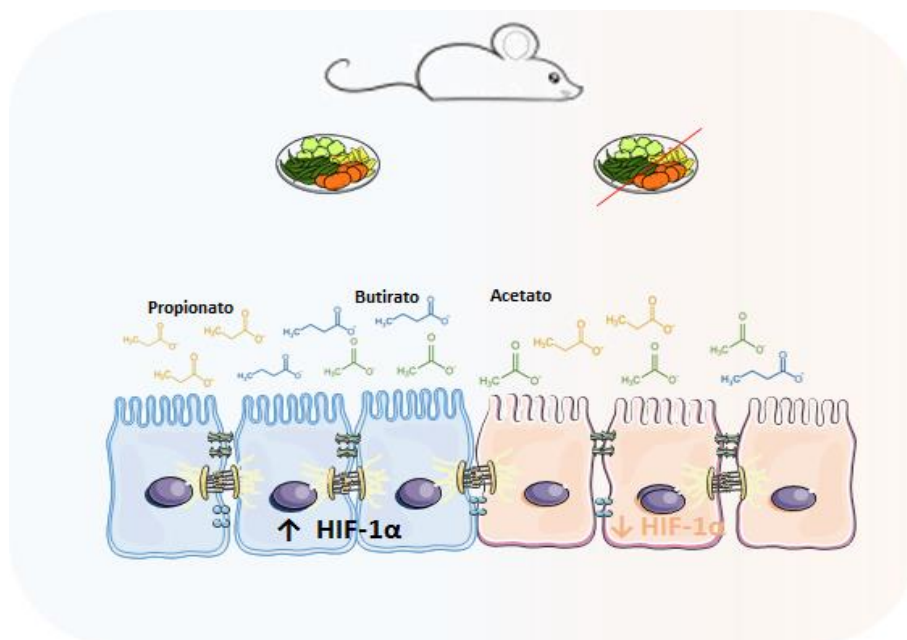


Figura 3. Esquema da hipótese do projeto. Com o aumento da disponibilidade de ácidos graxos de cadeia curta no epitélio intestinal devido à degradação de fibras no intestino, haverá maior expressão de HIF-1 α e, consequentemente, aumento da função de barreira.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a relevância da ingestão alimentar na disponibilidade dos ácidos graxos de cadeia curta e seus efeitos na estabilização do fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1 α) no epitélio intestinal do cólon.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção dos AGCCs no cólon de animais após ingestão alimentar;
- Analisar a estabilização de HIF-1 α em células epiteliais intestinais em modelo *in vivo* após ingestão alimentar;
- Examinar a expressão de genes alvos de HIF-1 α e sua relevância na manutenção da barreira intestinal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados

Para realizar os experimentos deste projeto, foram utilizados animais C57BL/6 provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP,

além da linhagem transgênica ODD-luciferase (HIF-1 α luciferase FVB.129S6Gt(ROSA)26Sor^{tm2(HIF1A/luc)} Kael/J), Villin-Cre (B6.Cg-Tg(Vil1-cre)997Gum/J) e HIF-1floxed (B6.129-Hif1atm3Rsjo/J) provenientes da Jackson Laboratory. Em todos os experimentos, foram utilizados camundongos machos e adultos. Os camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas e receberam comida e água autoclavadas durante todo o protocolo experimental, exceto quando pontuado. Eles foram mantidos em ciclo de 12 horas claro escuro, com temperatura e umidade relativa do ar monitorada. Todos os protocolos apresentados foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia da UNICAMP (protocolo número 4828-1/2018).

3.2 Condições dos grupos experimentais

Neste projeto foram utilizados três grupos experimentais: 1) **Jejum:** Animais foram mantidos em jejum de 24 horas; 2) **Realimentado:** Os animais desse grupo foram realimentados e, posteriormente, analisados após diferentes tempos da exposição à ração e 3) **Ad libitum:** animais mantidos com acesso livre à ração durante todo o protocolo experimental (Figura 4). Vale destacar, ainda, que os animais em jejum foram mantidos em gaiolas com maravalha sem resquícios de ração ou fezes, e a água foi oferecida *ad libitum* para todos os grupos. Tanto o jejum quanto a eutanásia dos animais foram realizados sempre no mesmo horário (14h), sendo animais dos diferentes grupos experimentais rapidamente eutanasiados para evitar a interferência do ciclo circadiano nas respostas analisadas.

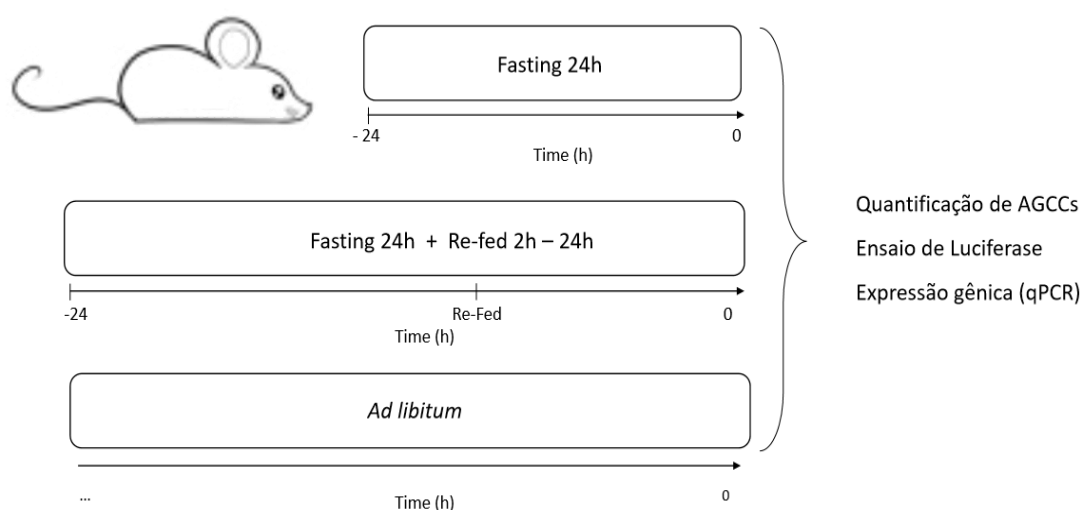


Figura 4. Protocolo experimental utilizado no projeto. Foram utilizados 3 camundongos machos por grupo em cada experimento, os quais receberam ração (comercial) de acordo com os períodos de jejum programado e água autoclavada durante todo o protocolo experimental.

3.3 Análise atividade de HIF *in vivo* - IVIS Spectrum

Para este experimento, utilizaram-se animais machos ODD-luciferase, separados em quatro grupos experimentais com dieta convencional: *ad libitum*, jejum 24h, realimentados após 6 ou 24h de jejum. Esses camundongos, como apresentado na figura 5, são *reporters* de estabilização de HIF-1 α . O imageamento foi realizado com um animal de cada grupo, sendo 3 animais por imagem. Os animais foram colocados em câmara de isoflurano (3%) com O₂ 2 L/min. Foi administrada solução de luciferina (VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade - P1041, Promega) i.p., na concentração de 50 mg/Kg, e, após 2 minutos, foi iniciado o imageamento no IVIS Spectrum. Durante o imageamento, os animais foram mantidos em anestesia com 2% de isoflurano. As imagens foram geradas em intervalos de 1 em 1 minuto, ao longo de 10 minutos.

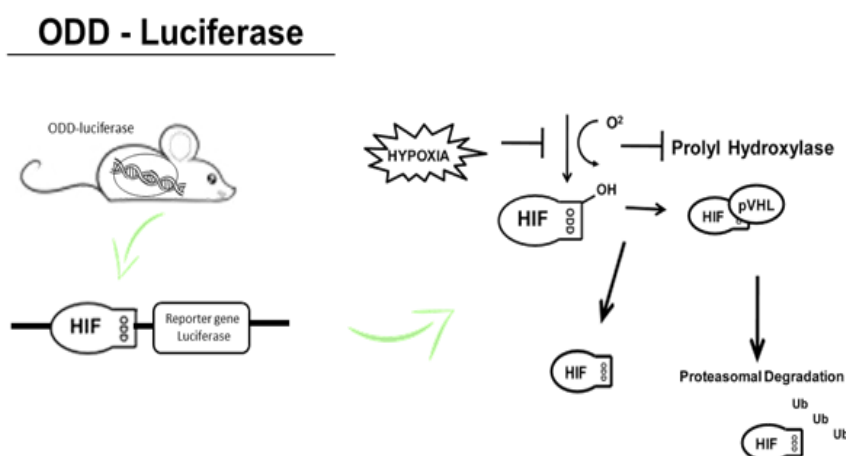


Figura 5. Esquema do animal transgênico ODD-luciferase. Camundongo da linhagem ODD luciferase FVB.129S6Gt(ROSA)26Sor^{tm2(HIF1A/luc)Kael/J}, proveniente da Jackson Laboratory.

3.4 Extração de proteínas para análise de atividade de luciferase

Após a eutanásia dos animais, coletou-se um fragmento do cólon (aproximadamente, 1,5 cm e 50 mg), ao qual foram adicionados 200 μ l de tampão de lise (a diluição foi realizada de acordo com a recomendada pelo fabricante – *Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer*, Promega E4030) com cloreto de cobalto 100 μ M (Synth). O tecido foi, então, triturado com politron até obter-se conteúdo homogêneo. As amostras foram congeladas em nitrogênio e descongeladas em banho-maria por 3 vezes e, em seguida, centrifugadas a 12.000 rpm, por 2 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, armazenado a -80 °C e utilizado para a quantificação da atividade de luciferase, conforme descrito a seguir (item 3.5).

3.5 Quantificação de luciferase em tecidos homogeneizados

A reconstituição do substrato da luciferase foi realizado de acordo com a recomendação do fabricante. Para leitura usamos placa branca, na qual foram adicionados 20 µl do lisado celular e 50 µl de substrato. A leitura foi realizada imediatamente após a adição do substrato em leitor de placas Biotek Synergy HT™ (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Os resultados foram normalizados a partir da quantificação de proteínas totais do material lisado através do método de Bradford, sendo calculada a razão da luminescência pela quantidade de proteínas presentes em cada amostra avaliada. As análises foram realizadas em duplicatas.

3.6 Quantificação de ácido graxo de cadeia curta

Os animais mantidos em diferentes condições de jejum tiveram seu conteúdo colônico coletado para a quantificação dos AGCCs. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para evitar a degradação do material a ser analisado. Em seguida, foram pesados 30 mg de amostra e adicionou-se solução padrão (20 mg de NaCl, 10 mg de ácido cítrico, 20 µL de HCl 0,1N e 100 µL de solvente butanol), adicionando, em seguida, 20 µL de ácido caprílico (0,5 mg/mL) e vortexou-se por 2 minutos, até se obter um aspecto homogêneo na solução. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, por 15 minutos, a 25 °C. Coletaram-se 50 µL da fase superior para a análise por cromatografia gasosa. As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa e as concentrações, calculadas com uso de curva padrão contendo os três AGCCs.

3.7 Genes-alvo de HIF

Camundongos C57BL/6 mantidos nas mesmas condições de tratamento foram utilizados para quantificar a expressão de alguns dos genes-alvo de HIF-1. Os animais foram eutanasiados, e as IECs, extraídas do cólon para PCR. Para a extração das IECs, o cólon foi lavado com PBS gelado. O tecido foi cortado em fragmentos de 0,5 cm e, em seguida, foram realizadas duas lavagens com HBSS suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF), e o sobrenadante foi descartado ao final das lavagens. Em seguida, incubou-se a 37° C, por 1 hora, com HBSS contendo EDTA 2 mM, vortexando-o a cada 10 minutos. Ao final da incubação, filtrou-se com *cell strainer* 70 µm (Cell Strainer, BD Bioscience) e centrifugou-se a 2000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuspenso em 1 mL de HBSS, e as células foram contadas com auxílio de câmara de Neubauer. Para o PCR, foram necessárias 2×10^6 células que foram, em seguida, ressuspenso em 600 µl tampão de lise do kit de extração de RNA (PureLink™ RNA - Ambion),

contendo 1% de β -mercaptoetanol (Bio-Rad). A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo do kit. Após a extração do RNA, as amostras foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro (Nanodrop), no comprimento de onda de 260 nm, e o grau de pureza, determinado pela razão 260/280 nm. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 μ g do RNA total extraído, utilizando o kit High Capacity cDNA reverse transcription, da Applied Bioscience (Life Technologies), e a quantificação da expressão gênica foi determinada por PCR em tempo real, através do software Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, utilizando SYBR™ Green Master Mix como fluoróforo (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e pares de primers específicos para os genes analisados, de acordo com a tabela 1. Os genes-alvo de HIF analisados foram o transportador de glicose do tipo 1 (*Slc2a1*), 6-fosfofruto-2-quinase / frutose2,6-bifosfatase 3 (*Pfkfb3*), mucina-2 (*Muc2*), fator de crescimento vascular endotelial (*Vegf*), Fator Trefoil-3 (*Tff3*) e claudina-1 (*Cldn1*), sendo β -2 microglobulina (*B2m*) o controle endógeno.

Tabela 1. Sequência sense e anti-sense dos primers.

Primer	Sequência (5' – 3')
<i>B2m</i>	CCCCACTGAGACTGATACATACG sense CGATCCCAGTAGACGGTCTTG anti-sense
<i>Vegf</i>	ATCGTCACCGTTGACAGAACA sense GGCATCCGAGTGAGGACATC anti-sense
<i>Pfkfb3</i>	GGAGGTCGGCATGTTGAAGA sense CTTTGGAAGGGCCTGAGAGG anti-sense
<i>Slc2a1</i>	CTTTGTGGCCTTCTTTGAAGT sense CCACACAGTTGCTCCACAT anti-sense
<i>Tff3</i>	TGCAGATTACGTTGGCCTGT sense TGCAGAGGTTTGAAGCACCA anti-sense
<i>Muc2</i>	CGACTGTGAGCAGTGTGTCA sense GGGTAGGGTCACCTCCATCT anti-sense
<i>Cldn1</i>	CACTTCCAGACTCCACCACC sense CGATCCATCCCAGAGAAGCC anti-sense
<i>Eubacteria</i>	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT sense ATTACCGCGGCGGCTGCTGGC anti-sense
<i>Hif1a</i>	TGCATGTGTATGGGTGTTTTG sense GAAAACTGTCTGTAACCTTCATTTC anti-sense

3.8 Análise da microbiota associada à mucosa

Após a eutanásia dos animais, coletamos 1 cm do cólon proximal, o qual foi, cuidadosamente, lavado com PBS autoclavado e, com auxílio de uma tesoura, foi aberto longitudinalmente. Com o fragmento do cólon aberto em uma placa de Petri, utilizou-se uma lâmina de bisturi para a retirada da camada de muco em contato direto com a mucosa intestinal. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a $800 \times g$, por 5 minutos, a 4°C . As amostras foram mantidas a -80°C e, depois, utilizadas para a realização de PCR quantitativo (qPCR) para análise da carga bacteriana (Jimeno, Brailey, Barral, 2018).

3.9 qPCR carga bacteriana

A extração foi realizada com o kit DNeasy Blood & Tissue Qiagen, e seguimos o protocolo do fabricante. As amostras foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro (Nanodrop) no comprimento de onda de 260 nm, e o grau de pureza, determinado pela razão 260/280 nm, e a quantificação da expressão gênica foi determinada por PCR em tempo real, através do software Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, utilizando SYBRTM Green Master Mix como fluoróforo (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e pares de primers específicos para os genes de *Eubacteria* de acordo com a tabela 1.

3.10 Curva padrão *E. coli* para análise da carga bacteriana

Para determinar a carga bacteriana fecal, uma curva padrão com diluições seriadas (1:10) foi empregada usando DNA genômico extraído de 1×10^9 UFC de *Escherichia coli* cultivada *in vitro* em meio ágar LA (Lauril sulfato + Ampicilina). Todas as amostras foram amplificadas seguindo o mesmo protocolo de amplificação por qPCR.

3.11 Extração das células da lâmina própria

O intestino foi removido e lavado com HBSS/HEPES para remover todo o material do conteúdo luminal. Após a lavagem, o intestino foi aberto longitudinalmente e cortado em fragmentos de, aproximadamente, 1,5 cm. Os fragmentos foram, então, colocados em tubo falcon com HBSS/EDTA, e foi feita homogeneização por 1 minuto, seguida de vortexamento por 20 segundos. A seguir, o sobrenadante contendo as IECs foi descartado. O procedimento foi repetido e, depois, os fragmentos foram lavados com HBSS/HEPES, sendo realizada a digestão do tecido. Para tanto, os tecidos foram colocados em erlenmeyer contendo meio RPMI com 0,18 µl de β-

mercapto e collagenase IV (concentração final 100 $\mu\text{L/mL}$) (Sigma-Aldrich) e incubou-se a 37 °C a 220 rpm por 40 minutos. Após a incubação, utilizou-se um *cell strainer* de 70 μm para filtrar as células (Cell Strainer, BD Bioscience), que, em seguida, foram lavadas com HBSS/HEPES e os fragmentos, descartados. As amostras após a filtragem foram centrifugadas a 2000 rpm, a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão no reagente de Percoll (Ge Healthcare Bio-Sciences AB) 40% e, cuidadosamente, adicionou-se o Percoll 70%, formando um gradiente. As células foram centrifugadas a 2000 rpm, a 4 °C, por 20 minutos, com aceleração e *break* no mínimo, e coletou-se a banda interfásica, aproximadamente 3 mL, adicionando-se PBS estéril para lavagem das células, e, novamente, centrifugou-se a 2000 rpm, a 4 °C, por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet, ressuspensão, em 1 mL de meio RPMI sem β -mercapto. A marcação foi realizada conforme descrito no item 3.12.

3.12 Marcação dos leucócitos

Para marcação, as células foram ressuspensas em HBSS sem soro, centrifugadas a 1500 rpm, 4 °C por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se o processo 1 vez. As amostras foram ressuspensas em 100 μL do mix de anticorpos e mantidas ao abrigo da luz por 20 minutos. Após esse período, foram centrifugadas a 12000 rpm, por 2 minutos, e descartou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 200 μL de tampão FACS, centrifugadas a 12000 rpm, por 2 minutos, e descartou-se o sobrenadante. Para marcação intracelular, as células foram incubadas com Perm Buffer (PBS com 0,1% de triton) por 30 minutos, e foi realizada a marcação utilizando o anticorpo de HIF-1, com incubação de 1 hora, a 4 °C, no escuro. Em seguida, adicionaram-se 200 μL de PBS, e as células foram adquiridas no citômetro FACSVerse (BD). Para análise da população de neutrófilos na lâmina própria, foram usados os anticorpos purificados anti-mouse, anti-Ly6G PE (BioLegend) clone 1A8 e anti-CD11b APC-Cy7 clone M1/70 (BioLegend); e, para os macrófagos, anti-F4/80 PE-Cy7, clone BM8 (BioLegend) e anti-CD11b PerCP clone M1/70 (BD Biosciences); para a marcação de células dendríticas, anti-mouse CD11c PE-Cy7, clone N418. (BioLegend); para a marcação de HIF-1, anti-mouse FITC, clone 241812 (R&D System); e, para a marcação de EpCAM, anti-mouse CD326 F4/80, clone G8.8 (BioLegend). Para análise, selecionou-se a população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, por meio de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Os resultados foram adquiridos no citômetro BD FACSVerse, com o software BD FACSSuiteTM, e analisados com software FlowJoTM. As estratégias de *gate* são demonstradas nas figuras dos resultados.

3.13 Tratamento com tributirina

Os camundongos ODD-luciferase foram mantidos em condição de jejum de 24h e receberam por gavagem 200 μ l de tributirina em diferentes períodos de tempo. Neste estudo tivemos os seguintes grupos experimentais: 1) animais em jejum de 24h; 2) animais realimentados por 24 horas; 3) animais em jejum de 24h que receberam tributirina 1 hora antes da eutanásia; 4) animais em jejum de 24h que receberam tributirina 4 hora antes da eutanásia; e 5) animais em jejum de 24h que receberam tributirina 8 horas antes da eutanásia. Após a eutanásia, coletou-se um fragmento do cólon proximal e procedemos ao processamento conforme descrito no item 3.4, para posterior quantificação de atividade de luciferase.

3.14 Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos são apresentados como média +/- erro padrão. Para as comparações entre dois grupos, foi utilizado o teste T de *student*. Para as comparações entre dois ou mais grupos, utilizou-se One-Way ANOVA e Tukey's multiple comparisons. As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 A ingestão alimentar altera a produção dos ácidos graxos de cadeia curta no intestino

A dinâmica entre a microbiota e o hospedeiro é de suma importância para a manutenção da homeostase e da saúde dele. Neste sentido, analisamos a produção de ácidos graxos de cadeia curta no cólon de animais que passaram por um período de 24 horas de jejum para sincronização da ingestão alimentar e, posteriormente, tiveram acesso à ração e eutanasiados em diferentes tempos (2 a 12 horas). Coletamos o conteúdo luminal do cólon, e a análise da quantificação de AGCCs foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa, e as concentrações, calculadas com uso de curva padrão contendo os três AGCCs. Com o intuito de reduzir o impacto do ciclo circadiano nos resultados obtidos, todos os animais foram eutanasiados no mesmo horário (14h ou ZT6, *zeitgeber time*).

Os dados obtidos após ingestão alimentar foram comparados utilizando o grupo *fasting* como controle. Os animais realimentados apresentaram aumento gradual na produção dos ácidos

graxos de cadeia curta de acordo com o tempo total de acesso a ração/período de realimentação (Fig. 6). O grupo *ad libitum* é utilizado como valor de referência do estado basal em todos os experimentos realizados.

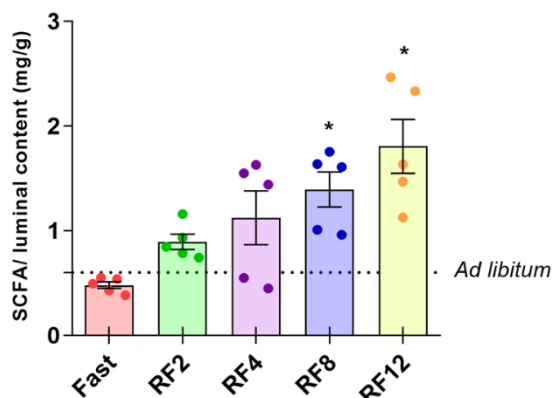


Figura 6. Quantificação total dos AGCCs no conteúdo luminal de animais ODD-luciferase. Os animais passaram por jejum de 24 horas (Fast) e, em seguida, por períodos de realimentação de 2 horas (RF2), 4 horas (RF4), 8 horas (RF8) e 12 horas (RF12), exceto o grupo *ad libitum*, que manteve o acesso livre à alimentação. A quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta foi realizada através de espectrometria gasosa. Cada valor representa a média $\pm$ SEM. ANOVA, * significância de $p < 0.05$ $n = 5$ animais por grupo.

Além da quantificação total dos AGCCs presentes no conteúdo luminal dos camundongos, analisamos as concentrações de cada um dos metabólitos de forma individual (acetato, propionato e butirato). Nessas análises, observamos que, a partir de 8 horas de realimentação, há um aumento na produção de acetato e butirato, enquanto que, para o propionato, esse aumento já está presente com 4 horas de realimentação (Fig.7).

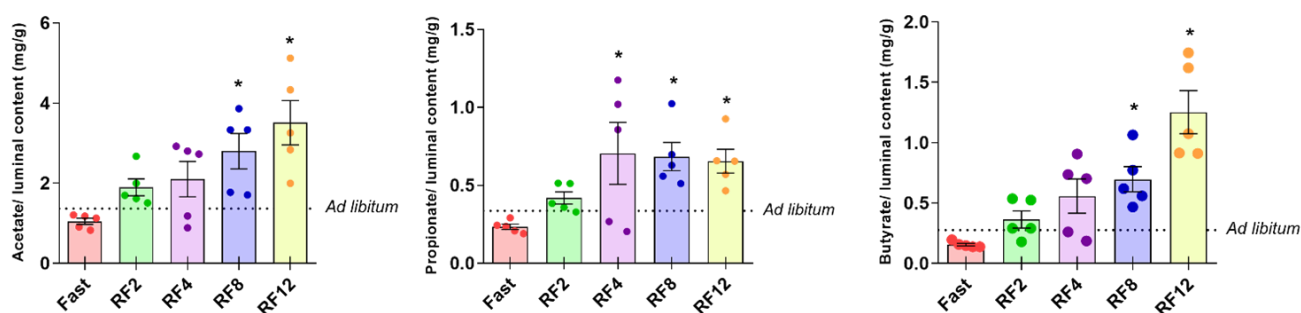


Figura 7. Quantificação individual dos AGCCs no conteúdo luminal de animais ODD-luciferase. Os animais passaram jejum de 24 horas (Fast) e, em seguida, por períodos de realimentação de 2 horas (RF2), 4 horas (RF4), 8 horas (RF8) e 12 horas (RF12), exceto o grupo *ad libitum*, que manteve o acesso livre à alimentação. A quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta foi realizada através de espectrometria gasosa. Cada valor representa a média $\pm$ SEM. ANOVA, * significância de $p < 0.05$ $n = 5$ animais por grupo.

Vale ressaltar que, nesses experimentos, utilizamos um grupo de animais que foi mantido com acesso à ração durante todo o protocolo experimental, *ad libitum*. Nesses, as concentrações

de AGCCs totais e, também, individuais foram maiores em relação aos animais em jejum, porém inferiores às dos realimentados, nos quais houve a "sincronização" da ingestão do alimento após o período de indisponibilidade dele (jejum). Após analisarmos as concentrações de AGCCs no conteúdo luminal dos camundongos em jejum e realimentados, questionamo-nos quanto à estabilidade de HIF-1 α no cólon dentro dos parâmetros de jejum e realimentação, e se essa se relacionava com a disponibilidade de AGCCs no epitélio intestinal.

4.2 A ingestão alimentar altera a estabilidade de HIF-1 α nas IECs do cólon

Os resultados obtidos foram a partir de ensaios realizados com animal transgênico, expressando o domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) do gene HIF-1 α , fundido a um gene *reporter* (luciferase). Esse gene transgênico é continuamente transcrito e traduzido em todas as células e, rapidamente, degradado sob condições de normóxia, mas, em condições de hipóxia, ele não é degradado, e a luciferase se acumula. Ao fornecer o substrato luciferina, tecidos em hipóxia podem ser visualizados com equipamento de bioluminescência (Goldman, *et al.*, 2011).

Considerando os dados obtidos e trabalho prévio que associou os AGCCs com a estabilização de HIF-1 em camundongos com inflamação intestinal (Kelly, *et al.* 2015), analisamos a estabilidade da subunidade alfa dessa proteína em camundongos nas condições de jejum de 24 horas e realimentados. Inicialmente, a análise foi realizada *in vivo* e, depois, com amostra obtida da porção proximal do cólon em animais ODD-luciferase. A análise realizada em corpo inteiro com o animal vivo mostrou uma maior luminescência na região abdominal dos animais que foram realimentados em relação aos animais mantidos em jejum (Fig. 8). Esses dados indicam diferenças na estabilização da proteína de HIF-1 α , sendo essa estabilizada em períodos de realimentação.

É importante esclarecer que, para este experimento, foram necessárias adaptações, pois utilizamos um equipamento em outro espaço (IVIS Spectrum) e, devido às dificuldades de transporte dos animais, os períodos de realimentação foram rearranjados. No entanto, não houve nenhum prejuízo para as análises, visto que demonstramos a estabilização de HIF após a ingestão alimentar.

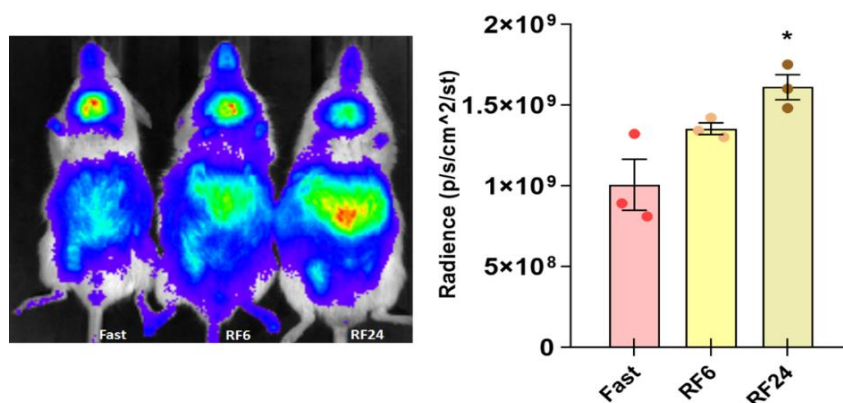


Figura 8. Detecção de bioluminescência total em animais ODD-luciferase. Imagem representativa da bioluminescência total realizada em animais alimentados com dieta convencional, divididos em grupos: jejum 24h, realimentado 6h e realimentado 24h. A bioluminescência foi avaliada pelo IVIS Spectrum. Cada valor representa a média $\pm$ SEM. ANOVA, com pós-teste de Kruskal-Wallis; * significância de $p < 0.05$ $n = 3$ animais por grupo.

A seguir, mensuramos a atividade de luciferase em amostras de cólon dos animais. Conforme apresentado na figura 9, o animal que teve 8 horas de realimentação (RF8) apresentou aumento na estabilidade de HIF-1 em relação aos animais *fasting* 24h. No grupo *ad libitum*, a quantidade de luminescência e, conseqüentemente, a estabilidade de HIF-1 α ficaram acima dos grupos *fasting* 24h e realimentado 8 horas (RF8). Em conjunto, os dados obtidos indicam diferenças na estabilização da proteína HIF-1 α no cólon de camundongos realimentados ou não.

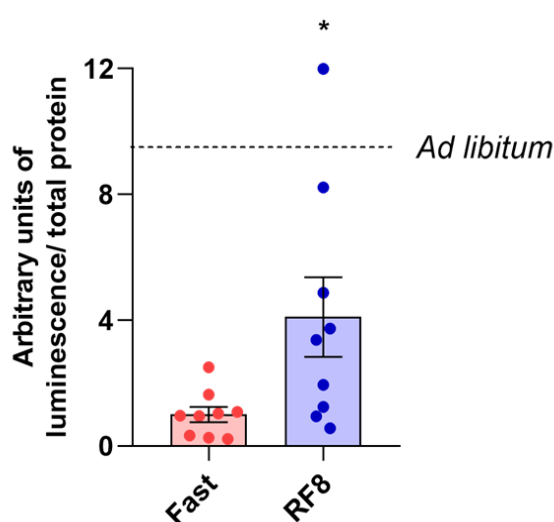


Figura 9. Análise da estabilização de HIF-1 α . Os animais passaram por jejum de 24 horas e, em seguida, por um período de realimentação de 8 horas. A atividade da luciferase (*reporter* de HIF-1 α) foi avaliada utilizando extratos do cólon proximal dos camundongos. Os valores foram normalizados por proteína. Cada valor representa a média $\pm$ SEM. Teste t de *student*, * significância de $p < 0.05$ $n = 9$ animais por grupo.

4.3 A ingestão alimentar altera a expressão de HIF-1 α e seus alvos nas IECs do cólon

A seguir, analisamos a porcentagem de células positivas para HIF-1 α dentre as IECs do cólon. Observamos que a ingestão de dieta aumentou significativamente a porcentagem de IECs positivas para HIF-1 α . Esse efeito foi observado a partir de 2 horas, ficando ainda mais evidente com 8 horas de realimentação, quando os valores ficaram próximos dos observados nos animais que estavam em *ad libitum* (Fig. 10).

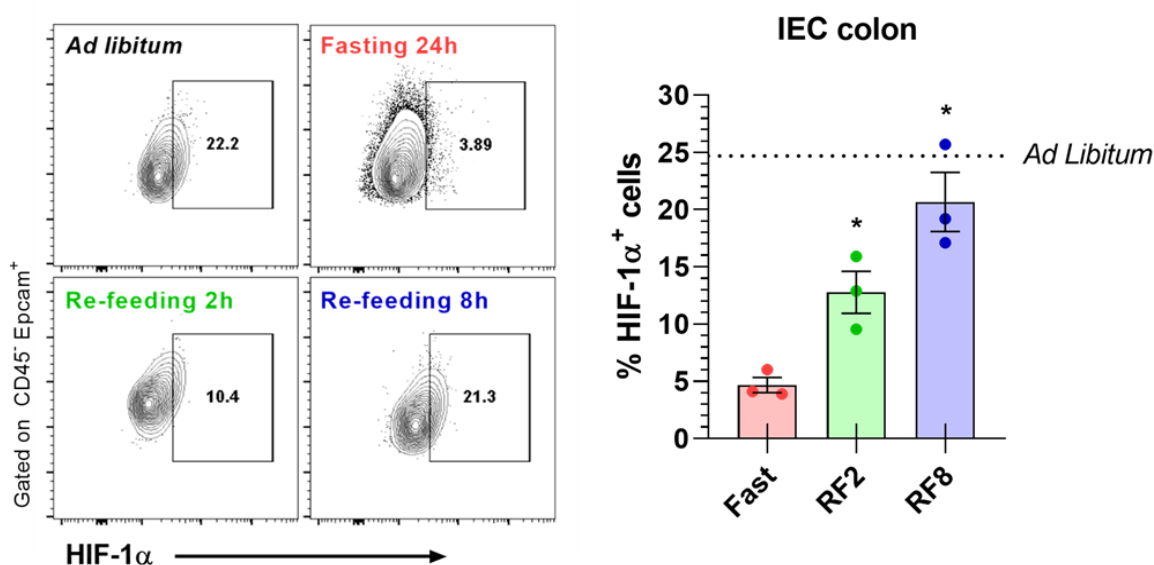


Figura 10. Marcação de HIF-1 α nas IECs do cólon por citometria de fluxo. Os animais passaram por jejum de 24 horas (Fast) e, em seguida, por períodos de realimentação de 2 horas (RF2) e 8 horas (RF8), exceto o grupo *ad libitum*, que manteve o acesso livre à alimentação. Cada valor representa a média $\pm$ SEM. ANOVA, * significância de $p < 0.05$ $n = 3$ animais por grupo.

Após avaliar a estabilidade da proteína HIF-1 α , realizamos um experimento a fim de analisar se a expressão do gene *Hif1a* estava sendo modulada. As células epiteliais intestinais do cólon dos camundongos foram coletadas e preparadas para análise de expressão gênica por RT-PCR. Conforme pode ser observado abaixo, o gene *Hif1a* não foi diferencialmente expresso nos grupos analisados (Figura 11).

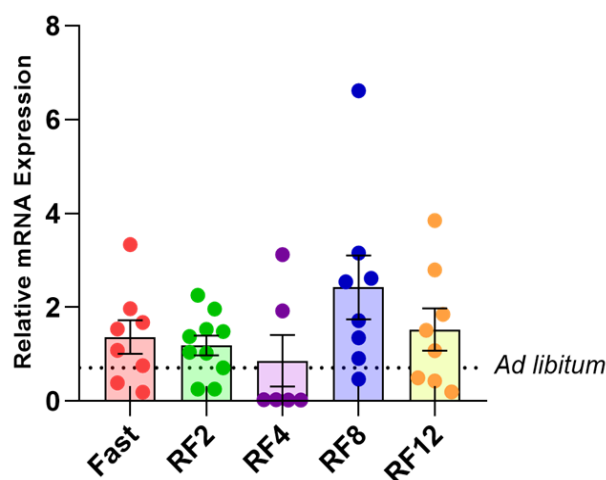


Figura 11. Análise do gene *Hif1a* em IECs de camundongos após ingestão alimentar. RT-qPCR a partir do RNA total extraído das células epiteliais intestinais do cólon de animais em jejum ou realimentados 2 horas (RF 2h), 4 horas (RF 4h), 8 horas (RF 8h) e 12 horas (RF 12h). Cada valor representa a média $\pm$ SEM. n = 8 animais por grupo.

Uma vez que a atividade do fator HIF-1 α pode ser regulada por diferentes mecanismos, e não apenas a nível transcricional (Glover, Lee e Colgan, 2016), a seguir analisamos a expressão de genes alvos desse fator e, também, a estabilização da proteína. Nesses experimentos consideramos apenas o tempo de 8 horas. Conforme apresentado na figura 12, observou-se mudança da expressão de quase todos os genes analisados no epitélio intestinal dos animais realimentados em relação aos em jejum.

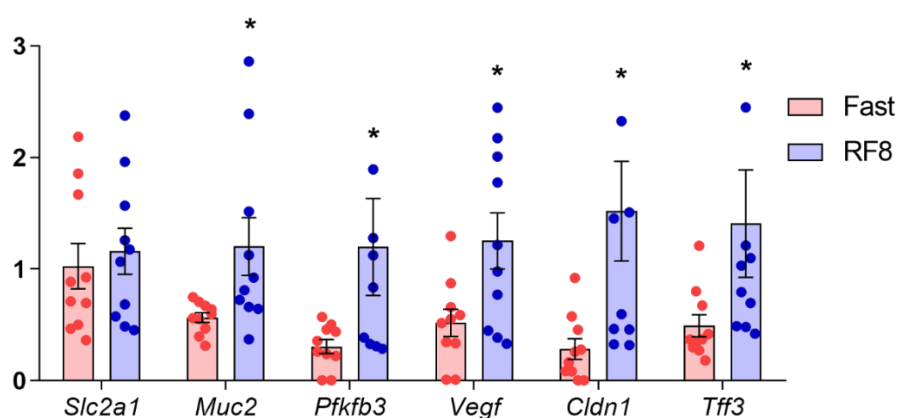


Figura 12. Análise de genes-alvo de HIF-1 em células epiteliais intestinais. RT-qPCR a partir do RNA total extraído das células epiteliais intestinais do cólon de animais em jejum ou realimentados 8h. Cada barra representa a média $\pm$ SEM, seguido por teste Mann Whitney com * significância de $p < 0,05$. n = 10 animais por grupo.

Nesse sentido, vemos que, após realimentação, há aumento da expressão de genes relacionados à produção de mucina (*Muc2*) e do *trefoil factor* intestinal (ITF ou *Tff3*), o qual, assim como as mucinas, tem sua relevância na formação da camada de muco (Glover, Lee e Colgan, 2016). Outros genes também tiveram a sua expressão aumentada, como o *Pfkfb3*, que está relacionado ao metabolismo glicolítico da célula, sendo um regulador chave do fluxo glicolítico

(Obach, *et al.*, 2004); a claudina-1 (*Cldn1*), um componente central da junção entre as células epiteliais intestinais (Glover, Lee e Colgan, 2016); e o fator de crescimento vascular endotelial (*Vegf*), que é conhecido por participar diretamente da angiogênese (Lee, *et al.*, 2004).

4.4 A estabilização de HIF-1 α observada após ingestão alimentar pode ser mediada por ácidos graxos de cadeia curta

A fim de analisar se a estabilização de HIF-1 α (observada nos grupos acima) é dependente dos AGCCs, em especial do butirato, realizamos um experimento com tributirina. A tributirina é um composto que contém três moléculas de ácido butírico. Quando hidrolisada, é rapidamente metabolizada no cólon, apresentando uma cinética mais eficiente em relação ao butirato (Vinolo *et al.*, 2012). Os animais foram mantidos em jejum por 24 horas, e, após esse período, foi realizada gavagem com tributirina, nos tempos de 1, 4 e 8 horas antes da eutanásia. Neste experimento também utilizamos um grupo com realimentação por 24 horas. Conforme pode ser observado abaixo, a tributirina foi capaz de estabilizar HIF-1 α no cólon dos camundongos. Esse efeito foi evidente após 4 e 8 horas da administração da tributirina (Fig. 13).

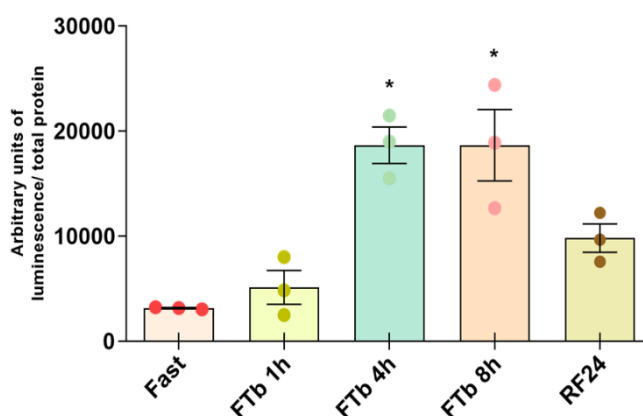


Figura 13. Análise da estabilização de HIF-1 em camundongos tratados com tributirina. Os animais passaram por um período de jejum de 24 horas, recebendo gavagem nos tempos de 1 hora (FTb 1h), 4 horas (FTb 4h) e 8 horas (FTb 8h), exceto o grupo realimentado 24 horas (RF24), que recebeu alimento após as 24 horas de jejum. A atividade da HIF foi avaliada pelo ensaio de luciferase. Cada valor representa a média $\pm$ SEM. ANOVA, * significância de $p < 0.05$. N = 3 animais por grupo.

4.5 A ingestão alimentar tem pouca influência na presença de células inflamatórias na lâmina própria

Quando há o comprometimento das funções de barreira, as células imunes inatas do epitélio intestinal podem ser ativadas propiciando o desenvolvimento de inflamações intestinais (Okumura, Takeda, 2017). Nesse sentido, analisamos se havia migração de células imunes inatas à

lâmina própria dos camundongos realimentados. Avaliamos quatro tipos celulares: neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas.

Conforme apresentado na figura 14, a realimentação promoveu uma redução no número de neutrófilos em relação ao *fasting*, mas isso não foi visto nas demais populações. No entanto, vemos que, mesmo com a realimentação, não houve redução de células inflamatórias a números basais, como observado nos animais com acesso *ad libitum* a ração, o que talvez possa ser explicado devido ao tempo de vida dessas células no tecido.

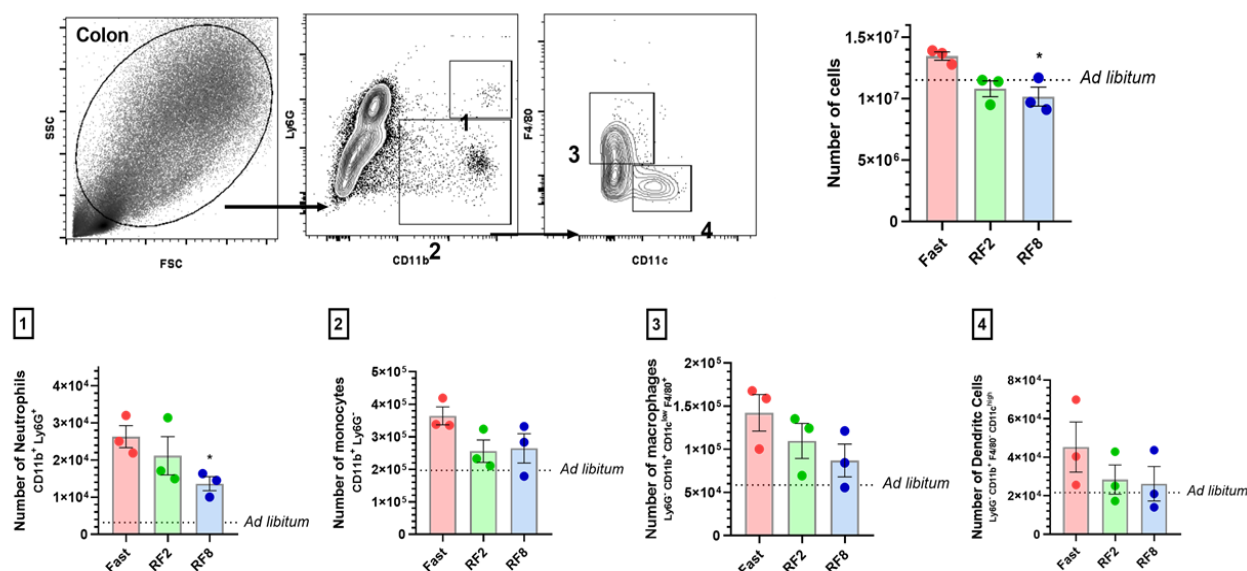


Figura 14. Análise das células mielóides no epitélio intestinal por citometria de fluxo. Os animais passaram por jejum de 24 horas (Fast) e, em seguida, por períodos de realimentação de 2 horas (RF2) e 8 horas (RF8), exceto o grupo *ad libitum*, que manteve o acesso livre à alimentação. Cada valor representa a média $\pm$ SEM. ANOVA, * significância de $p < 0.05$ $n = 3$ animais por grupo.

4.6 A ingestão alimentar aumenta a proliferação de IECs

A renovação das células do epitélio intestinal é um processo altamente regulado e essencial para a manutenção da função de barreira (Branca *et al.*, 2019). Sabe-se que os AGCCs gerados pela fermentação bacteriana têm efeitos importantes na diferenciação e proliferação celular no intestino. Considerando isso e as variações observadas nas concentrações de AGCCs após a realimentação, a seguir analisamos se a proliferação de células epiteliais seria modulada pela ingestão alimentar.

Conforme mostrado na figura 15, observamos que a realimentação aumentou o número de células epiteliais em proliferação no cólon. A análise da proliferação realizada a partir do ensaio de incorporação de EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) é amplamente utilizada para rastrear células em proliferação (Zhao *et al.*, 2013). Conforme apresentado abaixo, vemos que houve um aumento

da proliferação celular no grupo RF8. Observa-se que, após 8 horas, a proliferação de IECs é semelhante ao observado na condição *ad libitum*. Esse experimento foi realizado apenas uma vez e terá de ser repetido, mas indica que a ingestão alimentar regula agudamente a proliferação das células epiteliais intestinais, efeito esse que pode estar associado às maiores concentrações de AGCCs.

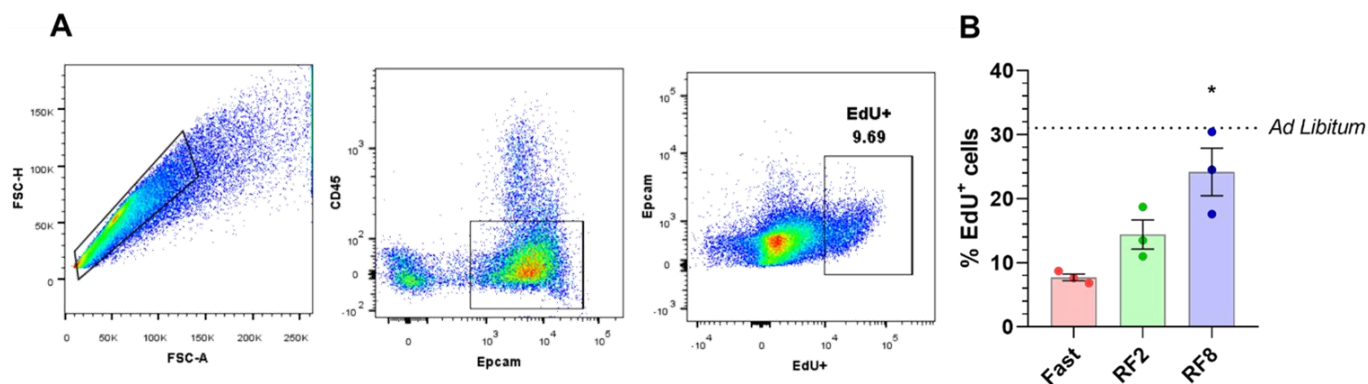


Figura 15. Proliferação das IECs do cólon por EdU. A) Imagem representativa da estratégia de *gate*. **B)** Os animais passaram por jejum de 24 horas (Fast) e, em seguida, por períodos de realimentação de 2 horas (RF2) e 8 horas (RF8), exceto o grupo *ad libitum*, que manteve o acesso livre à alimentação. O EdU foi injetado intraperitoneal 2h antes da coleta. Cada valor representa a média $\pm$ SEM. ANOVA, significância de $p < 0.05$ $n = 3$ animais por grupo

4.7 A ingestão alimentar modifica a interação das IECs com os componentes da microbiota intestinal, efeito esse que parece ser dependente de HIF-1 α

As células epiteliais intestinais e o muco juntos formam uma barreira que separa as células do hospedeiro da microbiota intestinal, limitando o acesso de bactérias ao epitélio. Dessa forma, o muco age em conjunto para manter a integridade da barreira intestinal (Capaldo, Domonica, Kalman, 2017). Nesses experimentos, analisamos quantitativamente as bactérias que estão em contato com o muco e em maior proximidade com as IECs. Para essa análise, coletamos a camada de muco do cólon proximal com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e a carga bacteriana foi analisada por qPCR.

Nesse contexto, analisamos a carga bacteriana presente na mucosa de animais *knockout* tecido específico para HIF-1 α (VilCre⁺HIF-1) e animais WT (VilCre⁻HIF-1) para esse mesmo gene. Desses dados pudemos tirar duas informações. A primeira delas é que, nos animais WT, após a ingestão de alimento, há uma redução da carga bacteriana associada à mucosa (Fig. 16). Esse dado indica que a realimentação altera a interação entre as bactérias associadas à mucosa e as células epiteliais, o que pode ser o resultado de maior produção de peptídeos antimicrobianos ou muco pelas células do epitélio intestinal dos animais realimentados. Um segundo ponto que

podemos levantar é que, em animais *knockout* para HIF-1, a carga bacteriana é maior do que em WT, o que pode indicar o envolvimento de HIF-1 α nesse efeito (Fig. 16).

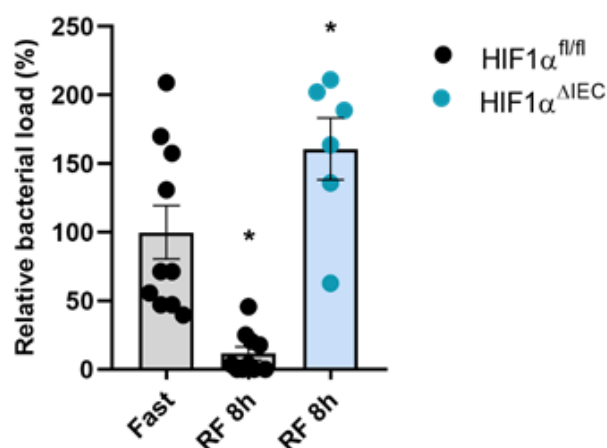


Figura 16. Análise da carga bacteriana por qPCR RT-qPCR a partir do DNA total extraído do muco do cólon proximal de animais que passaram por jejum de 24 horas (Fast); em seguida, os animais passaram por período de realimentação 8 horas (RF8). Cada valor representa a média $\pm$ SEM. ANOVA, * significância de $p < 0.05$ $n = 6-10$ animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigamos a relevância da ingestão alimentar na produção de ácidos graxos de cadeia curta e estabilização do fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1 α) no epitélio intestinal do cólon. Nossa hipótese inicial foi que, com a ingestão alimentar, haveria aumento da disponibilidade de ácidos graxos de cadeia curta e, consequentemente, estabilização de HIF-1 α e expressão de genes alvos, o que contribuiria para a função de barreira epitelial do intestino. Desta forma, utilizamos o modelo de jejum/realimentação para avaliar os efeitos fisiológicos desencadeado nas IECs. Como resultado, notamos que a ingestão alimentar altera a produção dos ácidos graxos de cadeia curta no intestino, sendo que, a partir de 8 horas de realimentação, há um aumento significativo de acetato e butirato. Observamos maior estabilidade de HIF-1 α após ingestão alimentar, assim como aumento da expressão de genes alvos de HIF-1 α nas IECs do cólon. Esses efeitos parecem ter relação com a concentração luminal dos AGCCs, particularmente, butirato. Por último, vimos, também, que há aumento na proliferação de IECs e modificação nas suas interações com componentes da microbiota intestinal, efeito esse que pode ser dependente de HIF-1 α .

Os AGCCs são os principais produtos finais da fermentação de carboidratos não digeríveis e fibras insolúveis, que, a partir da dieta, tornam-se disponíveis para a microbiota intestinal, sendo

os principais o acetato, o propionato e o butirato produzidos pela fermentação bacteriana intestinal. Essa produção ocorre no cólon, principalmente na região proximal, onde a concentração pode variar entre 70 a 140 mM. Após os AGCCs serem produzidos, são absorvidos rápida e eficientemente, sendo muito pouco excretados pelas fezes (Morrison & Preston, 2016). O butirato é extensivamente absorvido no cólon e atua como a principal fonte de energia para os colonócitos (Kelly *et al.*, 2015).

Dependendo da dieta, a concentração total de AGCCs diminui de 70 a 140 mM, no cólon proximal, para 20 a 70 mM. A quantidade e o tipo de fibra consumida têm efeito importante na composição da microbiota intestinal e, conseqüentemente, quantidade de AGCCs produzidos (Besten *et al.*, 2013). A dieta é reconhecida como um fator ambiental chave que modula a composição e as funções metabólicas. Nota-se que o consumo de componentes alimentares específicos, como as fibras, é uma via pela qual a microbiota pode ser alterada, bem como as atividades metabólicas microbianas, incluindo a produção de produtos finais, como os AGCCs (Holscher, 2017).

A hipóxia fisiológica do intestino é mantida, entre alguns fatores, através do metabolismo das IECs, uma vez que essas utilizam o butirato como substrato da sua fonte energética. Dessa forma, há uma via de mão dupla, em que as bactérias fermentadoras anaeróbias mantêm a produção dos AGCCs e, por sua vez, esses, através de mecanismos bioquímicos do metabolismo celular, consomem o oxigênio que é disponibilizado pelos vasos sanguíneos adjacentes ao intestino. Essa dinâmica é estritamente relacionada com a estrutura do cólon, garantindo a formação de um gradiente de concentração inversamente proporcional: onde há uma maior concentração de AGCCs, no lúmen, há uma menor tensão de oxigênio (Allaire *et al.*, 2018).

Dadas essas considerações, não é de surpreender que episódios antecipados ou imprevistos de jejum e realimentação afetem a abundância, composição e atividades da microbiota intestinal. Nesse contexto, destacamos a interdependência entre dieta (substrato), microbiota intestinal e metabolismo do hospedeiro. Alterações na disponibilidade de AGCCs e na microbiota estão associadas a perturbações no metabolismo do hospedeiro (Morrison & Preston, 2016). Os AGCCs têm uma atuação relevante no metabolismo energético das células epiteliais intestinais, contribuindo para a homeostase do epitélio, além de promover hipóxia tecidual e consequente ativação do HIF-1 α devido ao alto consumo metabólico de O₂ (Kelly *et al.*, 2015). Nesse sentido, as alterações observadas na produção dos AGCCs após a ingestão alimentar podem influenciar as funções epiteliais e constituir mecanismos relevantes na manutenção da homeostase intestinal, que parece ser dependente da estabilização de HIF-1.

As análises com o ensaio de luciferase nos mostraram que há uma estabilização da proteína HIF-1 α em diferentes períodos de realimentação, indicando-nos que a disponibilidade de ácidos graxos de cadeia curta provenientes da alimentação pode influenciar a estabilidade de HIF-1 α de alguma forma. Assim, também analisamos as células positivas para HIF-1 α nas IECs do cólon, o que confirmou nossa hipótese de que os AGCCs modulam HIF-1 α .

O HIF-1 α modula a transcrição de mais de 90 genes envolvidos na entrega de oxigênio para áreas hipóxicas, na renovação celular e no metabolismo da glicose, atuando na adaptação e sobrevivência das células em hipóxia (Popravka, *et al.* 2018). Nossos dados mostram um aumento na expressão relativa de genes alvos de HIF-1 α , que estão relacionados à via glicolítica associada ao metabolismo e ligados à estrutura da barreira epitelial, como produção de muco (mucina) e função de barreira (claudinas). A menor expressão de genes associados à produção de muco e a proteínas de junção pode indicar um enfraquecimento do epitélio na ausência de ingestão alimentar. A diminuição da expressão desses genes pode afetar a integridade da barreira epitelial, podendo aumentar o acesso de bactérias da própria microbiota à lâmina própria e, inclusive, a outros tecidos e órgãos. (Allaire *et al.*, 2018).

A regulação da claudina-1 dependente de HIF-1 α é central para a integridade da junção estreita do epitélio intestinal. A claudina-1 (CLDN1) é um componente central da morfologia juncional das IECs. HIF-1 α mantém a expressão de CLDN1 através da ligação de sequências do elemento de resposta à hipóxia (HRE) no promotor do gene, indicando uma ligação crítica entre o HIF-1 α e a função específica da TJ (*tight junctions*) como um mecanismo importante na barreira epitelial regulada pelo HIF-1 α (Glover, Lee e Colgan, 2016).

A camada de muco presente na superfície do cólon desempenha um papel crítico na proteção do epitélio intestinal. Dentro dessa camada de muco, há duas áreas: uma primeira camada interna, firme e livre de bactérias, que está em contato próximo com o epitélio intestinal; e uma segunda camada externa, menos firme, que fornece uma superfície lubrificada para o desenvolvimento do conteúdo luminal e um substrato nutricional para certas espécies de micro-organismos. É importante destacar que a densidade do muco não impede o acesso de metabólitos ao epitélio (Branca *et al.*, 2019; Capaldo, Domonica, Kalman, 2017).

A proteção da mucosa intestinal é representada pela produção das mucinas, dando destaque ao MUC2 e o TFF3. A falta de MUC2 permite que bactérias comensais entrem em contato diretamente com IECs e, assim, podem comprometer a integridade do epitélio e conduzir a uma inflamação intestinal. O TFF3 interage com o MUC2 e possui influência na viscosidade do muco e no reparo epitelial (Peterson, Artis, 2014; Kurashima, Kiyono, 2017). Um artigo publicado por Higashizono *et al.*, 2018 demonstra que a atrofia intestinal causada pelo jejum

representa uma grande mudança na sua morfologia, tornando a barreira mecânica intestinal vulnerável. Os linfócitos da lâmina própria e do espaço intraepitelial atuam como locais efetores da imunidade da mucosa intestinal. A perda desses linfócitos devido ao jejum de curto prazo pode resultar em deterioração da função da barreira imunológica intestinal. No entanto, esse foi um estudo realizado utilizando o intestino delgado; já em nosso trabalho, avaliamos as células imunes inatas no cólon.

A barreira física formada pelo muco e pelas células epiteliais intestinais impede o conflito entre a microbiota intestinal e as células imunológicas do hospedeiro. Quando há o comprometimento das funções de barreira, as células imunes inatas do epitélio intestinal podem ser ativadas propiciando o desenvolvimento de inflamações intestinais. Portanto, as células epiteliais intestinais estimuladas interagem com as células imunes do hospedeiro e modulam as respostas das células imunes do intestino (Okumura, Takeda, 2017). Nesse sentido, nosso estudo avaliou a migração de células imunes inatas. Nesse caso, os neutrófilos foram as únicas células que apresentaram uma redução em seus números quando da realimentação. Entretanto, mesmo com a realimentação, não houve redução das demais células inflamatórias a níveis basais, como o *ad libitum*, o que talvez possa decorrer do tempo de vida dessas células no tecido.

O epitélio intestinal é danificado por insulto físico, patológico ou bacteriano. Já o processo de recuperação da mucosa ocorre através de células imunes, células mesenquimais, células-tronco e IECs. De modo geral, o processo inflamatório está associado ao rápido acúmulo de neutrófilos e monócitos para uma resposta imune eficiente e para uma recuperação eficaz do tecido danificado (Kurashima, Kiyono, 2017). Em contrapartida, as análises com camundongos HIF-1^{ΔIEC} mostram aumento na carga bacteriana presente no muco e, após a realimentação, nota-se uma diminuição das bactérias. Além disso, a carga bacteriana é maior em *KO* do que em *WT*, o que indica envolvimento de HIF-1 α nesse processo, podendo, assim, ambos os efeitos estarem associados.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho evidenciou que a ingestão alimentar e, possivelmente, os AGCCs gerados pela fermentação das fibras alimentares, contribuem para a estabilização de HIF-1 α e expressão de seus genes alvos no epitélio intestinal, o que pode favorecer a função de barreira desse epitélio. Além disso, mostramos que a ausência de HIF-1 α possivelmente impacta a interação entre as IECs e a microbiota intestinal. No entanto, ainda são necessários experimentos complementares, incluindo análises em animais HIF-1 Δ IEC e seus controles, que nos fornecerão informações quanto à relação direta entre HIF-1 α e seus efeitos biológicos no epitélio intestinal no contexto do nosso trabalho.

7. REFERÊNCIAS

- ALLAIRE, J. M. *et al.* **The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity.** *Trends Immunol.* 2018 Sep; 39(9):677-696. doi: 10.1016/j.it.2018.04.002.
- AHMAD, M. *et al.* **Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice.** *Gut.* 2000, 46(4): 493–499.
- BESTEN, G. *et al.* **The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism.** *J Lipid Res.* 2013 Sep; 54(9): 2325–2340. doi: 10.1194/jlr.R036012
- BLANDER, J. M. *et al.* **Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host.** *Nat Immunol.* 2017 July 19; 18(8): 851–860. doi:10.1038/ni.3780.
- BRANCA, J. J. V.; GULISANO, M.; NICOLETTI, C. **Intestinal epithelial barrier functions in ageing.** *Ageing Research Reviews.* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100938>
- BRESTOFF, J. R.; ARTIS, D. **Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system.** *Nat Immunol.* 2013; 14(7): 676-84. doi: 10.1038/ni.2640.
- CANI, P. D. *et al.* **Microbial regulation of organismal energy homeostasis.** *Nature Metabolism.* 2019, 34-46.
- CAPALDO, C. T.; POWELL, D. N.; KALMAN, D. **Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier.** *J Mol Med (Berl).* 2017;95(9):927-934. doi:10.1007/s00109-017-1557-x
- CHEN, J.; VITETTA, L. **Inflammation-Modulating Effect of Butyrate in the Prevention of Colon Cancer by Dietary Fiber.** *Clinical Colorectal Cancer.* 2018; 17(3): e541-4
- COLGAN, S. P. **Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation.** *Immunity.* 2014;40(1):66-77
- CORRÊA, R. O. *et al.* **Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids.** *Clinical & Translational Immunology* 2016; 5: 1-8
- CUMMINGS, J.H; *et al.* **Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood.** *Gut.* 1987; 28(10):1221-1227.
- DONOHUE, D.R; GARGE N; ZHANG X; *et al.* **The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon.** *Cell Metab.* 2011. 13(5):517-26.
- FACHI, L. J. *et al.* **Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism.** *Cell Reports* 2019 Apr 16. 27(3):750-761.

FERREIRA, C. M.; VIEIRA, A. T.; VINOLO, M. A.; OLIVEIRA, F. A.; CURI, R.; MARTINS FDOS, S. **The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases.** J Immunol Res, 2014. doi: 10.1155/2014/689492.

GOLDMAN, S, J.*et al.* **Use of the ODD-Luciferase Transgene for the Non-Invasive Imaging of Spontaneous Tumors in Mice.** PLoS ONE 2011, 6(3):e18269. doi:10.1371/journal.pone.0018269

GLOVER, L. E; LEE, J. S; COLGAN, S. P. **Oxygen metabolism and barrier regulation in the intestinal mucosa.** J Clin Invest 2016, 126(10):3680-8. doi:10.1172/JCI84429

HIGASHIZONO, K. *et al.* **Effects of short-term fasting on gut-associated lymphoid tissue and intestinal morphology in mice.** Clinical Nutrition Experimental 2018, 6-14. doi.org/10.1016/j.yclnex.2017.12.002

HOLLSCHER, H. D. **Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota.** Gut Microbes. 2017; 8(2): 172–184. Published online 2017 Feb 6. doi: 10.1080/19490976.2017.1290756

HOOPER, L. V.; MIDTYEDT, T.; GORDON, J. I. **How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine.** Annu Rev Nutr, 2002; 22:283-307.

KELLY, C. J. *et al.* **Fundamental role for HIF-1 α in constitutive expression of human β defensin-1.** Nature. 2013 Nov, 6(6): 1110-1118.

KELLY, C. J. *et al.* **Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function.** Cell Host & Microbe 2015, 17: 1–10.

KURASHIMA,Y.; KIYONO,H. **Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing.** Annu. Rev. Immunol. 2017. 35:119–47. doi.org/10.1146/annurev-immunol051116-052424

LEE, J.W. *et al.* **Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions.** Experimental & Molecular Medicine 2004, 36(1): 1-12. doi:10.1038/emm.2004.1

LOUIS, N. A; HAMILTON, K. E; CANNY, G; SHEKELS, L. L; HO, S. B; COLGAN, S. P. **Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia.** J Cell Biochem 2006; 99(6):1616-27.

MAYNARD, C. L.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. **Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system.** Nature, 2012; 489(7415):23141. doi: 10.1038/nature11551.

MORRISON, D. J. & PRESTON, T. **Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism.** Gut Microbes, 2016, 7:3, 189-200, DOI: 10.1080/19490976.2015.1134082

NOWARSKI, R.; JACKSON R.; FLAVELL, R. A. **The Stromal Intervention: Regulation of Immunity and Inflammation at the Epithelial-Mesenchymal Barrier.** Cell. 2017 Jan 26;168(3):362-375. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.040

OBACH, M. *et al.* **6-Phosphofructo-2-kinase (*pfkfb3*) Gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia.** J Biol Chem 2004 Dec 17, 279(51):53562-53570. DOI: 10.1074/jbc.M406096200

OKUMURA, R.; TAKEDA, K. **Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis.** Exp Mol Med. 2017 May; 49(5): e338. doi: 10.1038/emmm.2017.20

PETERSON, L.W.; ARTIS, D. **Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis.** Nature Reviews Immunology. 2014 March. doi:10.1038/nri3608

POPRAVKA, E.S.; LINKOVA, N. S.; TROFIMOVA, S. V.; KHAVINSON, V. Kh. **HIF-1 as a Marker of Age-Related Diseases Associated with Tissue Hypoxia.** Biology Bulletin Reviews, 2018, 8(6):497–508

PURCHIARONI, F.; TORTORA, A.; GRABRIELLI, M.; *et al.* **The role of intestinal microbiota and the immune system.** Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013; 17(3):323-33.

ROEDIGER, W. E. **Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon.** Gastroenterology 1982, 83:424–429.

SAEEDI, B. J., *et al.* **HIF-dependent regulation of claudin-1 is central to intestinal epithelial tight junction integrity.** Mol Biol Cell. 2015;26(12):2252-62.

SCHULTHESS, J., *et al.* **The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages.** Immunity. 2019, 50: 432–445.

SEMENZA, G. L. **Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level.** Physiology (Bethesda) 2004; 19:176-82.

SOMMER, F.; BACKHED. F. **The gut microbiota--masters of host development and physiology.** Nat Rev Microbiol, 2013; 11(4):227-38. doi: 10.1038/nrmicro2974.

TAYLOR, C. T.; COLGAN, S. P. **Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches.** Nature Reviews Immunology 2017, 774–785.

THAISS, C. A. *et al.* **Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations.** Cell, 2016; 167(6):1495-1495. doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.003

TROMPETTE, A.; *et al.* **Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis.** Nat Med, 2014; 20(2):159-66. doi: 10.1038/nm.3444.

VINOLO, M. A *et al.* **Tributylin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice.** Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012; 303: E272–E282

ZEITOUNI, N. E., CHOTIKATUM S.; von KOCKRITZ-BLICKWEDE, M.; NAIM, H. Y. **The impact of hypoxia on intestinal epithelial cell functions: consequences for invasion by bacterial pathogens.** Mol Cell Pediatr 2016; 3(1):14.

ZHAO, G. *et al.* **MiR-130b Is a Prognostic Marker and Inhibits Cell Proliferation and Invasion in Pancreatic Cancer through Targeting STAT3.** PLoS ONE, 2013 38(9): e73803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073803>

XUE X; RAMAKRISHMAN, S.K; SHAH, Y.M. **Activation of HIF-1alpha does not increase intestinal tumorigenesis.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2014; 307(2):G187-95.

ANEXO I – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – Adendo



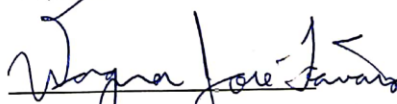
CERTIFICADO

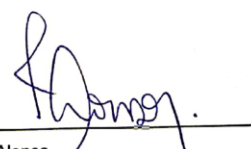
Certificamos que a proposta intitulada **Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta sobre a ativação de HIF-1 α no epitélio intestinal**, registrada com o nº **4828-1(A)/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo e Jaqueline de Souza Felipe**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em **22 de novembro de 2018**.

Finalidade:	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/06/2018-01/06/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	22/11/2018-01/06/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/cAnUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	02 meses / 25g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / ODD-luciferase
No. de animais:	36
Idade/Peso:	02 meses / 25g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / Mpr8-CreIDTR
No. de animais:	108
Idade/Peso:	02 meses / 25g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Animais SPF, Área de Imunologia, DGE/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 22 de novembro de 2018.


Prof. Dr. Wagner José Fátaro
Coordenador


Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO II – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta sobre a ativação de HIF-1α no epitélio intestinal, registrada com o nº 4828-1/2018, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo e Jaqueline de Souza Felipe, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 17 de maio de 2018.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/06/2018-01/06/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/06/2018-01/06/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	02 meses / 25g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Animais SPF, Área de Imunologia, DGEB/IB/UNICAMP

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / ODD-luciferase
No. de animais:	36
Idade/Peso:	02 meses / 25g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / Mpr8-CreIDTR
No. de animais:	108
Idade/Peso:	02 meses / 25g
Sexo:	machos
Origem:	Biotério de Animais SPF, Área de Imunologia, DGEB/IB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Animais SPF, Área de Imunologia, DGEB/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 17 de maio de 2018.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Coordenador


Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO III – Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Análise do efeito da ingestão alimentar e produção intestinal de ácidos graxos de cadeia curta sobre a expressão de genes alvo de HIF-1 em células epiteliais intestinais**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 18 de setembro de 2020

Assinatura : Jaqueline Felipe
Nome do(a) autor(a): **Jaqueline de Souza Felipe**
RG n.º 48.823.794-4

Assinatura : Marco Aurélio Ramirez Vinolo
Nome do(a) orientador(a): **Marco Aurélio Ramirez Vinolo**
RG n.º 33269470-7