



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas



Caroline Lobo Costa

**DANO AO SISTEMA ANTI-INFLAMATÓRIO COLINÉRGICO PELO CONSUMO
DE DIETA HIPERLIPÍDICA EM MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR *DEXTRAN SULFATE SODIUM* (DSS).**

LIMEIRA

2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas



Caroline Lobo Costa

**DANO AO SISTEMA ANTI-INFLAMATÓRIO COLINÉRGICO PELO CONSUMO
DE DIETA HIPERLIPÍDICA EM MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR *DEXTRAN SULFATE SODIUM* (DSS).**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo na área de Ciências Nutricionais e Metabolismo.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni.

Coorientador(a): Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CAROLINE LOBO COSTA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCIO TORSONI.

LIMEIRA

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

C823d Costa, Caroline Lobo, 1992-
Dano ao sistema anti-inflamatório colinérgico pelo consumo de dieta hiperlipídica em modelo de colite experimental induzida por *dextran sulfate sodium* (DSS) / Caroline Lobo Costa. – Limeira, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Marcio Alberto Torsoni.

Coorientador: Adriana Souza Torsoni.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Receptor nicotínico de acetilcolina alfa7. 2. Inflamação. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Colite. 5. Permeabilidade intestinal. I. Torsoni, Marcio Alberto, 1967-. II. Torsoni, Adriana Souza, 1973-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Damage to the cholinergic anti-inflammatory system by the consumption of a high-fat diet in an experimental colitis model induced by dextran sulfate sodium (DSS)

Palavras-chave em inglês:

Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor

Inflammation

Diet, high-fat

Colitis

Intestinal permeability

Área de concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Marcio Alberto Torsoni [Orientador]

Fernando Moreira Simabuco

Livia Aparecida D'avila Bitencourt Pascoal Biazzo

Data de defesa: 15-08-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2792-5551>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5498020477264916>

Folha de Aprovação

Autor(a): Caroline Lobo Costa

Título: DANO AO SISTEMA ANTI-INFLAMATÓRIO COLINÉRGICO PELO CONSUMO DE DIETA HIPERLIPÍDICA EM MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *DEXTRAN SULFATE SODIUM* (DSS).

Natureza: Dissertação

Área de Concentração: Metabolismo

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 15 de Agosto de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni (orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Fernando Moreira Simabuco (membro
interno) Faculdade de Ciências Aplicadas -
FCA/Unicamp

Profa. Dra. Livia Aparecida Davila Bitencourt Pascoal Biazzo (membro externo)
Pontifícia Universidade Católica de Campinas - PUCCAMP

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

É com profunda gratidão que dirijo estas palavras de agradecimento a todos vocês neste momento tão especial em minha vida, a defesa do meu Mestrado. Gostaria de expressar minha sincera apreciação por todo o apoio, incentivo e contribuições valiosas que cada um de vocês ofereceu ao longo desta jornada.

Em primeiro lugar, quero expressar minha gratidão a Deus, por guiar meus passos, fornecer força e sabedoria ao longo desta jornada acadêmica. Sua presença constante e suporte incondicional foram fundamentais para superar os desafios e alcançar este marco importante em minha vida.

Aos meus amados pais, Christiane e Paulo, vocês são os pilares inabaláveis em minha vida, sempre acreditando em mim e me encorajando a seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores. Sei que posso contar com o amor e o apoio incondicional de vocês, e sou imensamente grata por tudo que fizeram por mim.

À minha amada família, estendo meu sincero agradecimento por todo o suporte emocional e compreensão durante os altos e baixos desta jornada acadêmica. Suas palavras de encorajamento e incentivo foram fundamentais para me manter motivada e confiante em meu trabalho.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni, minha coorientadora, Profa. Dra. Adriana Torsoni, por suas orientações sábias, experiências e dedicação inabalável ao longo deste projeto. Suas expertises e conselhos foram fundamentais para moldar meu caminho de pesquisa e me desafiar a alcançar um novo patamar de excelência acadêmica. Sou grata pela paciência, apoio constante e confiança em minhas habilidades.

Não posso deixar de agradecer aos meus colaboradores, cujas contribuições foram de valor inestimável para o sucesso desta pesquisa. Suas ideias, sugestões e insights enriqueceram minha compreensão do tema e ajudaram a fortalecer as bases do meu trabalho. Obrigada por compartilharem seu conhecimento e por tornarem essa experiência ainda mais enriquecedora.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer aos meus amigos. Vocês estiveram ao meu lado, me apoiando, me animando e compartilhando momentos memoráveis ao longo desta jornada. Suas palavras de encorajamento, abraços reconfortantes e ombros amigos foram fundamentais para me manter

motivada e lembrar-me da importância de buscar o equilíbrio entre os estudos e a vida pessoal.

Por fim, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Seu apoio financeiro e reconhecimento do valor desta investigação científica foram cruciais para que eu pudesse desenvolver meu estudo de forma consistente e alcançar resultados relevantes. Agradeço a oportunidade concedida e por acreditar no potencial dos jovens pesquisadores brasileiros.

Não posso deixar de expressar minha gratidão à banca avaliadora por dedicar seu tempo e expertise para avaliar meu trabalho. Suas sugestões e críticas construtivas são inestimáveis para o aprimoramento desta pesquisa. Agradeço a oportunidade de receber sua orientação e aprender com suas vastas experiências.

Este momento de celebração não seria completo sem expressar minha profunda gratidão a cada um de vocês. Sei que não teria chegado até aqui sem a presença e o apoio de todos. Cada palavra amiga, gesto de carinho e ato de confiança foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço do fundo do meu coração por fazerem parte da minha jornada de mestrado e por terem acreditado em mim. Serei eternamente grata por todo o amor, suporte e dedicação que recebi de cada um de vocês.

Com gratidão,
Caroline Lobo Costa

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais são de etiologia multifatorial. Os aspectos emocionais e nutricionais estão diretamente relacionados a evolução da doença. A presença de marcadores inflamatórios, como citocinas e infiltrados celulares, e alteração na permeabilidade intestinal são aspectos comuns de ambas as patologias. Estudos recentes têm empregado métodos de estímulo do nervo vago e ativação do receptor colinérgico nicotínico de acetilcolina do tipo $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$). O $\alpha 7nAChR$, através da via JAK2-STAT3, é capaz de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias em vários tipos celulares. Em estudos anteriores demonstramos que uma dieta rica em gordura saturada (HFD) e processos inflamatórios reduzem a expressão do receptor $\alpha 7nAChR$, potencializando a resposta inflamatória. OBJETIVO: utilizando modelo animal C57BL/6J e com deleção do gene *Chrna7* ($\alpha 7nAChR$) (camundongos $\alpha 7^{-/-}$), investigamos como o consumo de dieta hiperlipídica e o processo inflamatório da colite ulcerativa, participam da modulação da expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ no intestino e o papel deste receptor na evolução da colite experimental em camundongos. MÉTODOS: Camundongos C57BL/6J (n=15/grupo) foram alocados em grupo controle (CT) ou HFD (45%) na 6ª semana de vida. As dietas foram oferecidas por 4 semanas. Em seguida, parte desses camundongos foi exposta ao *Dextran Sulfate Sodium* (DSS 2,5%) adicionado à água potável por 7 dias para induzir a colite. Assim, surgiram os grupos: CT, CT+DSS, HFD e HFD+DSS. Além disso, camundongos $\alpha 7^{-/-}$ (n=5/grupo) foram divididos em grupo CT ou HFD (45%) na 6ª a 10ª semana de vida. Células epiteliais do cólon e isoladas do cólon (IEC) foram coletadas para análise de Western Blotting e RT-qPCR. RESULTADOS: CT+DSS apresentou maior escore DAI no 4º e 7º dia e perda de peso corporal em comparação ao grupo HFD. O comprimento do cólon, houve redução no grupo HFD e CT+DSS, em relação ao grupo CT, bem como no grupo HFD+DSS em relação ao grupo HFD. As células epiteliais do cólon da HFD mostraram uma redução na expressão dos genes *Tjp1*, *Occludin*, *Tnfa* e *Chrna7* em comparação com CT. Além disso, o consumo de HFD reduziu o conteúdo proteico de $\alpha 7nAChR$, *Claudin1*, *Claudin2* e *Ocludina* em comparação com CT. A permeabilidade intestinal no grupo HFD+DSS foi maior do que nos grupos CT+DSS e HFD. Camundongos $KO\alpha 7$ alimentados com HFD mostraram cólon curto, conteúdo reduzido de proteína *Claudin2*, bem como expressão dos genes *Claudin4* e *Tjp1* em comparação com CT. CONCLUSÃO: Assim, HFD encurta o cólon independente da colite, mas exacerba a permeabilidade intestinal em animais com colite. A redução do receptor $\alpha 7nAChR$ em células epiteliais pode estar potencializando uma resposta inflamatória em camundongos C57BL/6J expostos à HFD. Em camundongos $KO\alpha 7$ com HFD mostraram encurtamento do cólon, conteúdo proteico de *Claudin2* reduzido, bem como expressão gênica de *Claudin4* e *Tjp1*.

Palavras-chave: $\alpha 7nAChR$, inflamação, dieta hiperlipídica, colite e permeabilidade intestinal.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases have a multifactorial etiology. Emotional and nutritional aspects are directly related to the evolution of the disease. The presence of inflammatory markers, such as cytokines and cellular infiltrates, and changes in intestinal permeability are common aspects of both pathologies. Recent studies have employed methods of vagus nerve stimulation and activation of the $\alpha 7$ -type nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) to reduce inflammatory process. The receptor $\alpha 7$ nAChR can reduce the expression of inflammatory cytokines through the JAK2-STAT3 pathway in several cell types. In previous studies we demonstrated that a diet rich in saturated fat (HFD) and inflammatory processes reduce the expression of the $\alpha 7$ nAChR, potentiating the inflammatory response. **OBJECTIVE:** using an animal model with deletion of *Chrna7* gene ($\alpha 7$ nAChR) ($\alpha 7^{-/-}$ mice), we investigated how the consumption of a high-fat diet and the inflammatory process of ulcerative colitis participate in the modulation of the expression of the $\alpha 7$ nAChR receptor in the intestine and the role of this receptor in the evolution of experimental colitis in mice. **METHODS:** C57BL/6J mice (n=15/group) were assigned to a control (CT) or HFD (45%) group at the 6th week of life. Diets were offered for 4 weeks. Then part of these mice was exposed to Dextran Sulfate Sodium (DSS 2.5%) added to drinking water for 7 days to induce colitis. Thus, the groups emerged: CT, CT+DSS, HFD and HFD+DSS. Furthermore, $\alpha 7^{-/-}$ mice (n=5/group) were divided into CT or HFD (45%) group from the 6th to the 10th week of life. Colonic and isolated colonic epithelial cells (IEC) were collected for Western Blotting and RT-qPCR analysis. **RESULTS:** CT+DSS showed higher DAI score on the 4th and 7th day and body weight loss compared to the HFD group. Regarding the length of the colon, there was a reduction in the HFD and CT+DSS group, in relation to the CT group, as well as in the HFD+DSS group in relation to the HFD group. Colonic epithelial cells from HFD showed a reduction in the expression of *Tjp1*, *Occludin*, *Tnfa* and *Chrna7* genes compared to CT. Furthermore, HFD consumption reduced the protein content of $\alpha 7$ nAChR, *Claudin1*, *Claudin2* and *Occludin* compared to CT. Intestinal permeability in the HFD+DSS group was higher than in the CT+DSS and HFD groups. HFD-fed $\text{KO}\alpha 7$ mice showed a short colon, reduced *Claudin2* protein content, as well as *Claudin4* and *Tjp1* gene expression compared to CT. **CONCLUSION:** HFD shortens the colon independent of colitis but exacerbates intestinal permeability in animals with colitis. The reduction of the $\alpha 7$ nAChR receptor in epithelial cells may be potentiating an inflammatory response in C57BL/6J mice exposed to HFD. In $\text{KO}\alpha 7$ mice with HFD presented colon shortening, reduced *Claudin2* protein content, as well as *Claudin4* and *Tjp1* gene expression.

Keywords: $\alpha 7$ nAChR, inflammation, hyperlipidic diet, colitis and intestinal permeability.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina
AGS – Ácidos graxos saturados
DC – Doença de Cronh
DII – Doença Inflamatória Intestinal
DSS – Dextran sulfato de sódio
EPI – Epigonadal
EPIC - do inglês *European Prospective Investigation into Cancer*
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
HFD – do inglês “*Hight Fat Diet*”
HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamonio
IAD – Índice de atividade da doença
IEC – do inglês *Intestinal Epithelial cell*
IL-6 - Interleucina-6
JAK2 - *Janus* quinase-2
KO α 7 – Animal *Knockout* para o receptor *a7*
LPS – Lipopolissacarideo
MPO – Mieloperoxidase
MUFA – Ac. Graxos Monoinsaturados
MYD88 – Fator de diferenciação mielóide 88
NE – Noradrenalina
NFkB – Fator nuclear *kappa* B
ob/ob – linhagem de camundongo geneticamente obeso
PUFA – Ac. Graxos Poli-insaturados
RCU – Retocolite Ulcerativa
RET – Retroperitoneal
RT-PCR – do inglês *Real time-Polymerase chain reaction*
SIgA – Imunoglobulina A
SIRT1 – proteína *Sirtuína* 1
STAT3 - proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição-3
TJ - do inglês “*Tight-junction*”
TLR4 – do inglês *Toll like receptor 4*
TNF- α - Fator de necrose tumoral- α
WB – do inglês *Western blot*
WT – do inglês *Wild Type*
ZO-1 – proteína *Zonula occludens-1*
 α 7nAChR - receptor colinérgico nicotínico de acetilcolina do tipo α 7

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
1.1- Doenças Inflamatórias Intestinais	12
1.2- Efeito da obesidade e ácidos graxos da dieta sobre doenças inflamatórias intestinais	15
1.3- Participação de receptores colinérgicos nicotínicos de acetilcolina do tipo $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) em Doenças Inflamatórias Intestinais	17
1.4- Efeito da obesidade e consumo de HFD sobre a expressão de $\alpha 7nAChR$	20
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	21
3 OBJETIVO GERAL	21
3.1-Objetivos específicos	21
4 METODOLOGIA.....	22
4.1-Characterização do modelo experimental	23
4.1.1-Animais utilizados	23
4.2-Dieta experimental	24
4.3-Indução da colite por DSS e avaliação da atividade da doença.....	25
4.4-Isolamento de Células Epiteliais Intestinais (IEC).....	26
4.5-Análise da expressão gênica.....	26
4.5.1-Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.....	26
4.6-Avaliação da quantidade e fosforilação das proteínas	27
4.6.1-Expressão proteica por Western blotting.....	27
4.6.2-Imunofluorescência	27
4.7-Medida de permeabilidade intestinal.....	28
4.8-Dosagem de atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido	28
4.9-Avaliação histológica do cólon	28
4.10-Análise Estatística	29
5 RESULTADOS	29
5.1-A expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ e do TNF- α em células epiteliais intestinais isoladas está reduzida em camundongos que consumiram dieta hiperlipídica.....	29
5.2-A expressão genica das proteínas de junção da barreira intestinal, TJP1 e Ocludina, está reduzida nos camundongos que consumiram dieta hiperlipídica.	30

5.3-A dieta hiperlipídica atenuou o escore do índice de atividade da doença (DAI) de colite induzida por DSS em camundongos.....	31
5.4-O consumo de dieta hiperlipídica por quatro semanas promove o encurtamento do cólon e aumenta a permeabilidade paracelular do cólon na colite.....	34
5.5- A colite induzida por DSS levou ao agravamento da infiltração inflamatória do cólon em camundongos, independente da dieta.	34
5.6-A expressão de proteínas de junção da barreira intestinal e de $\alpha 7nAChR$ em IEC do cólon é afetada pelo consumo de HFD e pelo DSS	35
5.7- Os animais $KO\alpha 7$ que consumiram dieta hiperlipídica por 4 semanas, apresentaram diminuição do comprimento do cólon.....	37
5.8- O cólon dos animais $KO\alpha 7$ que consumiram dieta hiperlipídica por 4 semanas apresentou redução da expressão de Claudina4, Claudina1 e Tjp1.	37
5.9- Animais $KO\alpha 7$ alimentados com dieta controle apresentaram aumento dos níveis proteicos de ZO1, Ocludina e Claudina2 no cólon, enquanto animais $KO\alpha 7$ alimentados com dieta hiperlipídica por 4 semanas apresentaram redução de Claudina2.....	38
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

1.1- Doenças Inflamatórias Intestinais

O processo inflamatório é um componente importante do sistema imune e tem papel fundamental no controle dos processos infecciosos, através da redução ou extinção do estímulo que causa o dano tecidual. O descontrole deste processo está associado ao desenvolvimento de diversas patologias, tais como: artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, câncer, sepse e doenças inflamatórias do intestino (DII).

As duas DII mais comuns em humanos são a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa que tem alta morbidade e vêm aumentando consideravelmente no mundo, principalmente no norte da Europa, nos Estados Unidos e Austrália (SHAMOON; MARTIN; O'BRIEN, 2019). No Brasil estudos epidemiológicos mostram que a prevalência de DII tem aumentado, como demonstrado para o estado de São Paulo (GASPARINI; SASSAKI; SAAD-HOSSNE, 2018), na região de Campinas mostrou uma prevalência estimada de DII de 15,59 casos/100.000 habitantes (FUCILINI et al., 2021) e de maneira similar na América Latina e Caribe (KOTZE et al., 2020).

A doença de Crohn (DC) é caracterizada por uma inflamação gastrointestinal com lesões transmuralis recidivas causadas principalmente pelo descontrole da resposta imune (WALLACE et al., 2014). Os danos podem ocorrer em várias partes do trato digestório, desde a boca até o ânus, mas afetam principalmente a região do íleo terminal, cólon e ânus (BAUMGART, 2010; HANAUER; MEYERS, 2001; LICHTENSTEIN et al., 2018). A Retocolite Ulcerativa (RCU) é uma doença inflamatória não-transmural recorrente e que afeta principalmente o cólon, mas o processo inflamatório progride continuamente do reto ao ceco (BAUMGART, 2010). Ambas as doenças estão associadas a perda de apetite, perda de peso, diarreia, dor, sangramento e dilatação intestinal (BAUMGART, 2010), mas os tratamentos existentes apenas induzem a remissão da doença, diminuindo os sintomas (SCHWANKE et al., 2016; TRIANTAFILLIDIS; MERIKAS; GEORGOPOULOS, 2011).

Na colite ulcerativa, a extensão e as características das lesões determinam a gravidade da doença e a fisiopatologia tem sido associada ao aumento da permeabilidade intestinal e fezes contendo sangue e muco (LAKHAN; KIRCHGESSNER, 2011; ORDÁS et al., 2012).

Fatores genéticos e ambientais estão associados ao desenvolvimento de colite ulcerativa. A incidência é maior em países que adotaram um estilo de vida

industrializado, restringindo uma evolução do sistema imunológico da mucosa, resultando em uma resposta imune inadequada, o que sugere que fatores ambientais podem influenciar no desencadeamento da doença (ORDÁS et al., 2012).

A RCU é uma doença de barreira intestinal impulsionada por uma disfunção estrutural no epitélio intestinal, por fortes mediadores inflamatórios e células na lâmina própria. Os macrófagos da lâmina própria, em um processo normal, fornecem sinais para as células-tronco intestinais, que dão origem a células epiteliais intestinais (HIEMSTRA et al., 2014; SEHGAL et al., 2018). Entretanto, tanto modelos experimentais, como camundongos, quanto pacientes com DII apresentam números significativamente elevados de macrófagos pró inflamatórios no cólon (BAIN et al., 2013; PLATT et al., 2010; RUGTVEIT et al., 1997; THIESEN et al., 2013).

Evidências sugerem que disfunções da imunidade inata e adaptativa contribuem para a resposta inflamatória intestinal em pacientes com DII. As duas principais DII apresentam formas claramente distintas da imunidade adaptativa na inflamação intestinal: enquanto a DC é caracterizada por uma resposta de células Th1, a RCU está associada a uma resposta por células auxiliares tipo 2 (Th2) (COBRIN; ABREU, 2005; DI SABATINO et al., 2012; TARGAN; KARP, 2005).

Ainda no contexto da imunidade, um aumento na atividade de neutrófilos foi observado em pacientes com DII (HANSBERRY et al., 2017). Esse aumento esteve associado à liberação de TNF- α e à presença de lipopolissacarídeos, dois fatores que contribuem para a ativação de neutrófilos. Em camundongos com colite induzida, foi observado um acúmulo de neutrófilos extracelulares no cólon, acompanhado de morte celular epitelial por apoptose, rompimento das junções firmes, aumento da permeabilidade e aumento da translocação bacteriana e inflamação (MARONEK et al., 2021).

Evidências mostram que a disfunção da barreira da mucosa intestinal, especialmente da célula de *Paneth*, participa do início e progressão das doenças inflamatórias intestinais (WANG et al., 2003). As células de *Paneth* desempenham papel vital na manutenção da homeostase intestinal, produzindo materiais antimicrobianos e controlando o equilíbrio comensal do hospedeiro. Outros fatores que também contribuem para eficácia da barreira são as secreções de muco das células caliciformes e imunoglobulinas de plasmócitos (KURASHIMA; GOTO; KIYONO, 2013) (Figura 1). Notavelmente tanto a quantidade das células de Paneth, quanto a liberação de fatores antimicrobianos pelas células de Paneth estão reduzidos em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios (*High Fat Diet* - HFD) (LEE

et al., 2017), mostrando que este tipo de dieta afeta componentes da barreira e a manutenção da integridade da barreira intestinal.

Em um ambiente ideal, barreira epitelial intestinal é constituída por vários tipos de células, tais como enterócitos, células de *Paneth*, células globet, cada uma delas desempenhando funções específicas. Abaixo desta camada epitelial existe o tecido conectivo (lâmina própria), que tem papel fundamental na comunicação entre o microbioma e as células do sistema imune, tais como células dendríticas, linfócitos B e T e macrófagos. Na camada epitelial (IEC) a célula mais abundante é o enterócito, que apresenta a importante função de controlar a passagem de íons e moléculas do lúmen para o interior do tecido (RESCIGNO, 2011; SUZUKI, 2013). Esse controle é realizado por proteínas de junção de oclusão (*Tight Junctions*) tais como claudinas, ocludina e *zonula occludens* (GÜNZEL; YU, 2013). Em 1986 a *zonula occludens*-1 (ZO-1) foi a primeira proteína de junção identificada. A ZO-1 atua como um componente de ancoragem ligando as proteínas transmembranares ao citoesqueleto (SILICIANO; MOOSEKER, 1986). As claudinas, por sua vez, classificadas com funções de barreira, como a claudina-1, ou com propriedades de formação de poros, como a claudina-2, estão localizadas nas junções firmes da via paracelular (LU et al., 2013).

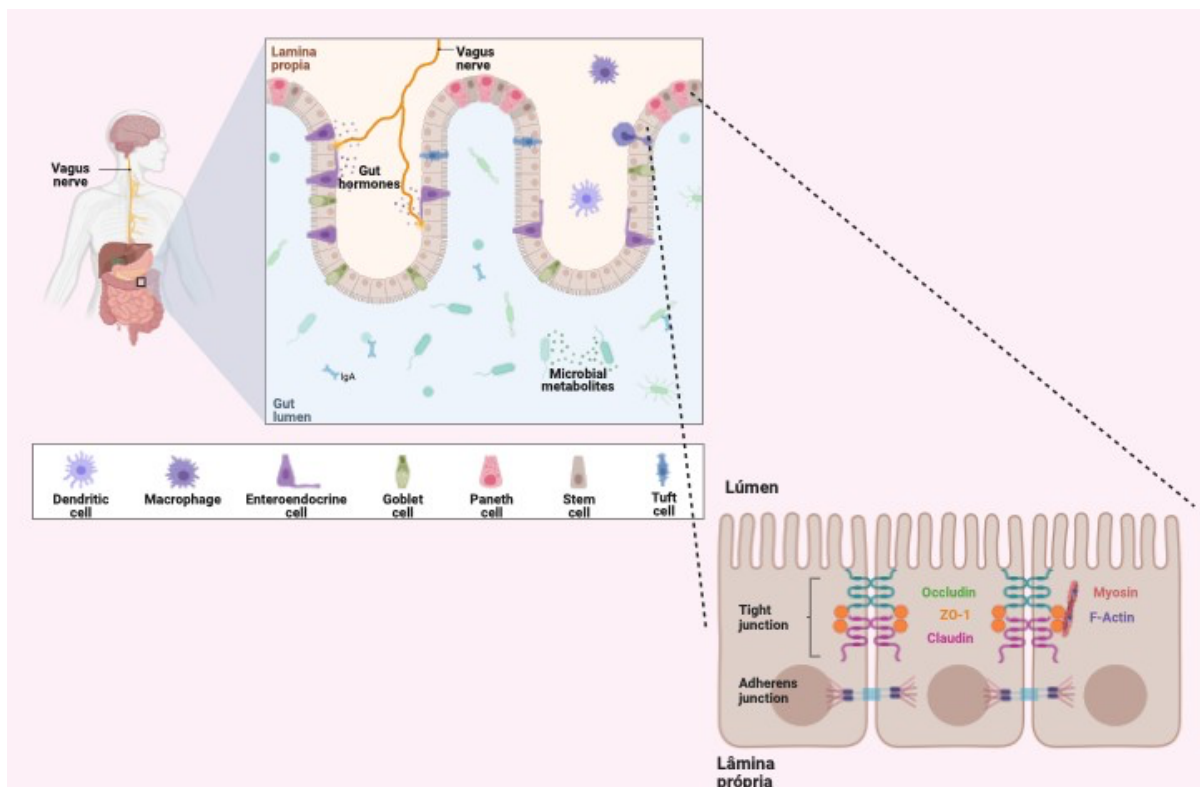


Fig 1. Barreira intestinal. O epitélio intestinal é constituído por uma monocamada de células epiteliais que incluem células M, células caliciformes, células *Paneth* e *Tight-junction*. Estas células desempenham papéis críticos na regulação da microbiota e na resposta imune do hospedeiro. Uma camada de muco contém peptídeos antimicrobianos e mucinas, que são produzidos por células de *Paneth* e células caliciformes, respectivamente, bem como imunoglobulina A (SIgA) secretora, que participa do processo de transcitose por células epiteliais (Adaptado: (COX; WEST; CRIPPS, 2015))

1.2- Efeito da obesidade e ácidos graxos da dieta sobre doenças inflamatórias intestinais

A relação entre a obesidade e as DII é bastante controversa. Uma recente revisão de Szilagyi (SZILAGYI, 2020) trouxe à discussão aspectos comuns que são importantes entre estas patologias. Alguns estudos sugerem que a obesidade está associada ao aumento de marcadores de inflamação e de permeabilidade intestinal (BILSKI et al., 2019; LAKHAN; KIRCHGESSNER, 2011). Além disso, a contribuição de componentes da dieta para a incidência de DII também tem sido investigada.

Considerando as propriedades pró-inflamatórias de ácidos graxos saturados (AGS) e seu efeito sobre a microbiota, esse componente da dieta tem sido alvo de estudos em modelos animais e humanos. Em modelos animais alguns estudos indicam o efeito potencial de AGS na incidência de DII e de maneira independente da obesidade (GRUBER et al., 2013; PAIK, J., FIERCE, Y., TREUTING, P. M., BRABB, T., AND MAGGIO-PRICE, 2013). Em humanos existem poucos estudos e resultados que mostram a relação positiva ou nula com a incidência de DII (ANDERSEN et al., 2017; HOU, J. K., ABRAHAM, B., AND EL-SERAG, 2011). Por outro lado, os ácidos graxos mono e poli-insaturados (MUFA e PUFA), através de suas propriedades anti-inflamatórias e das mudanças induzidas na microbiota intestinal (GHOSH et al., 2013; PUSCEDDU et al., 2015), parecem ter efeito benéfico sobre DII, como demonstrado pelo *European Prospective Investigation into Cancer* (EPIC) (DE SILVA et al., 2014).

Outro aspecto em comum entre obesidade e DII é a contribuição que a microbiota intestinal tem para a patofisiologia de ambas. O consumo de dietas ricas em gorduras induz mudanças na microbiota que resultam em maior permeabilidade intestinal e levam a endotoxemia metabólica e inflamação (FRAZIER; DIBASE; MCCLAIN, 2011). Estudos em modelos animais de obesidade genética (camundongos deficientes de receptor de leptina – ob/ob) mostram que estes animais

apresentam redução de Bacteroidetes e aumento de Firmicutes na microbiota intestinal (LEY et al., 2005), com achados similares em humanos obesos (LEY, R. E., TURNBAUGH, P. J., KLEIN, S., AND GORDON, 2006). Um estudo recente realizado com humanos mostrou que a dieta pró-inflamatória pode estar associada ao aumento do risco e atividade da DC. A dieta com alto índice inflamatório envolve potencialmente a DC por mediar alterações na microbiota, como o aumento de *Morganella morganii* e *Veillonella parvula* e a diminuição de *Coprococcus eutactus* no grupo das dietas pró-inflamatórias, assim como na DC (TIAN et al., 2022).

Os defeitos na barreira intestinal e o aumento da permeabilidade em indivíduos obesos foram relatados por Genser e colaboradores. O estudo mostrou que uma dieta baseada em lipídios comprometia a barreira intestinal, através da redução de ocludina e tricelulina, proteínas transmembranares responsáveis pela integridade da barreira. Os níveis séricos de zonulina, proteína ligante do citoesqueleto, também estavam aumentados em pacientes obesos (GENSER et al., 2018).

Além disso, como mencionado acima, o fato da dieta hiperlipídica aumentar a permeabilidade intestinal, parece ser decorrente da redução da expressão de proteínas componentes das “*Tight junctions*” (CANI et al., 2007; CANI; DELZENNE, 2007; CANI, 2007). Em uma revisão de 2007, os autores mostraram que a inflamação associada à obesidade em camundongos também tem origem no intestino e, mais precisamente, através da produção de moléculas específicas derivadas da microbiota intestinal, como o lipopolissacarídeo (LPS), uma condição denominada endotoxemia metabólica (CANI, 2007). Em situações normais, a entrada de LPS na circulação é controlada de forma adequada pelo sistema imunológico e mecanismos de desintoxicação (GUERVILLE; BOUDRY, 2016), mas em humanos e roedores com obesidade e diabetes, os níveis plasmáticos de LPS são, pelo menos, duplicados em comparação com aqueles em controles saudáveis, mesmo em jejum (CANI, 2007).

O LPS pode se ligar ao *Toll-like receptor 4* (TLR4) promovendo a ativação de várias vias imunológicas clássicas (QIAN C, 2013). Uma destas vias é dependente de MYD88 e ativa NF- κ B que promove a transcrição de várias citocinas e quimiocinas, com papel importante no desenvolvimento da obesidade e distúrbios metabólicos (CANI, 2007) (Figura 2). Além das células do sistema imune, o TLR4 é expresso em outros tipos celulares e está envolvido com a ativação de vias inflamatórias nestas células (SHI et al., 2006).

Assim, a dieta rica em AGS, a obesidade, a permeabilidade intestinal e a ativação de vias inflamatórias no intestino parecem estar associadas a DII.

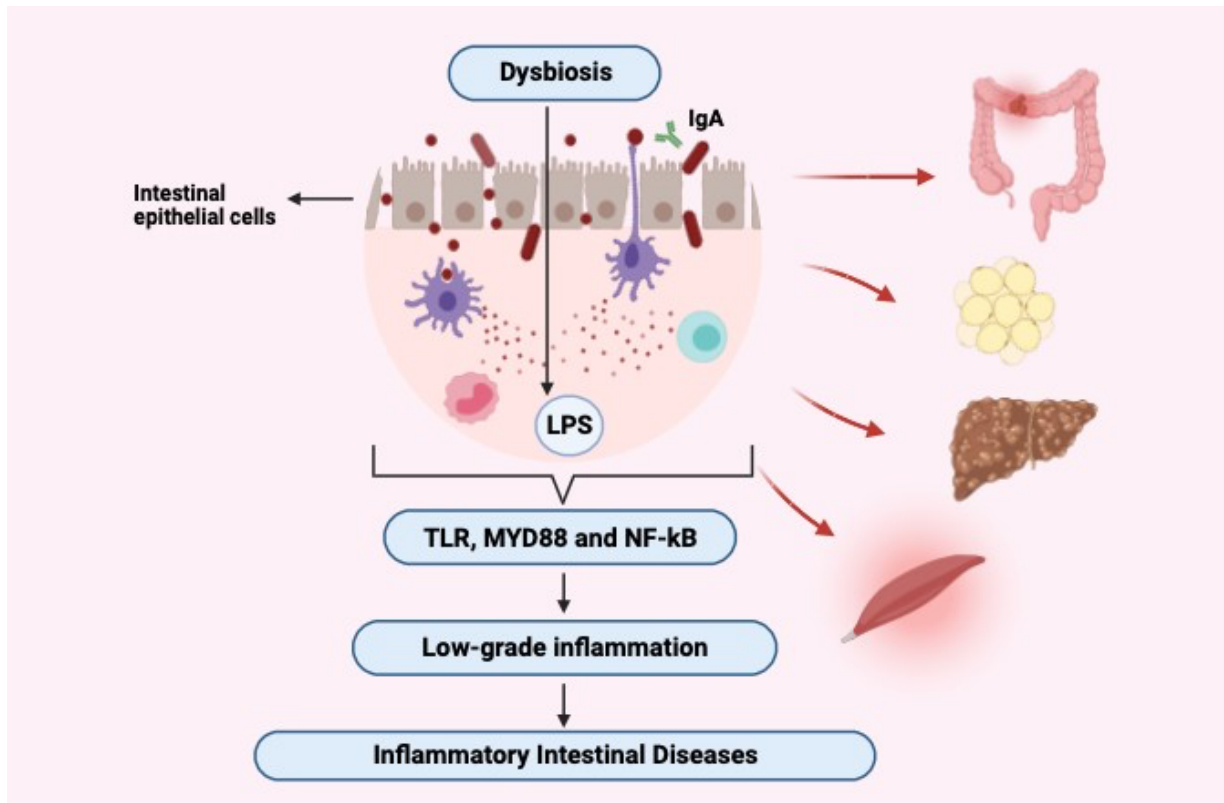


Fig 2. Disfunção da barreira intestinal e inflamação na obesidade. A alteração da microbiota intestinal observada na obesidade está associada a permeabilidade intestinal, redução de proteínas *Tight-junctions* (TJ), e uma resposta imune com a produção de peptídeo antimicrobiano, como a imunoglobulina A (IgA). Esses defeitos estão envolvidos no aumento dos níveis de LPS (endotoxemia metabólica), que se liga ao receptor Toll-like 4 (TLR4), ativando vias imunológicas, como a proteína de diferenciação mieloide MYD88 e NF- κ B, levando à produção de uma resposta inflamatória. A inflamação crônica e de baixo grau é o principal fator para o aparecimento de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares, também visto no câncer. (Adaptado: CANI, 2018).

1.3- Participação de receptores colinérgicos nicotínicos de acetilcolina do tipo $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) em Doenças Inflamatórias Intestinais

Como exposto até o momento, a ativação de vias inflamatórias tem participação fundamental na fisiologia da DII. Assim, qualquer mecanismo capaz de reduzir a produção de citocinas inflamatórias tem potencial participação na prevenção/tratamento destas patologias. Neste sentido, o estudo desenvolvido por Ghia et al. demonstrou a função protetora e anti-inflamatória do nervo vago em

modelos murinos de colite aguda, assim como o papel dos receptores colinérgicos nicotínicos e de macrófagos (GHIA et al., 2006).

Esse efeito anti-inflamatório, com participação da via colinérgica, é conhecido como via anti-inflamatória colinérgica e resulta na inibição da produção de citocinas através da ativação dos receptores $\alpha 7$ nAChR (DI GIOVANGIULIO et al., 2016; WANG et al., 2003). No baço a via anti-inflamatória colinérgica funciona através do estímulo do nervo vago que estimula a secreção de noradrenalina pelo nervo esplênico. A noradrenalina, por sua vez, se liga aos receptores $\beta 2$ adrenérgicos em células T para produzir e liberar a acetilcolina (ACh). A ACh produzida e secretada pelas células T se liga ao receptor $\alpha 7$ nAChR nos macrófagos e ativa, através de fosforilação, a Janus quinase-2 (JAK-2) e, em seguida, a proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição-3 (STAT-3) (ROSAS-BALLINA, et al., 2011). Uma vez ativada, a STAT3 migra para o núcleo inibindo a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (JONGE et al., 2005)(Figura.3).

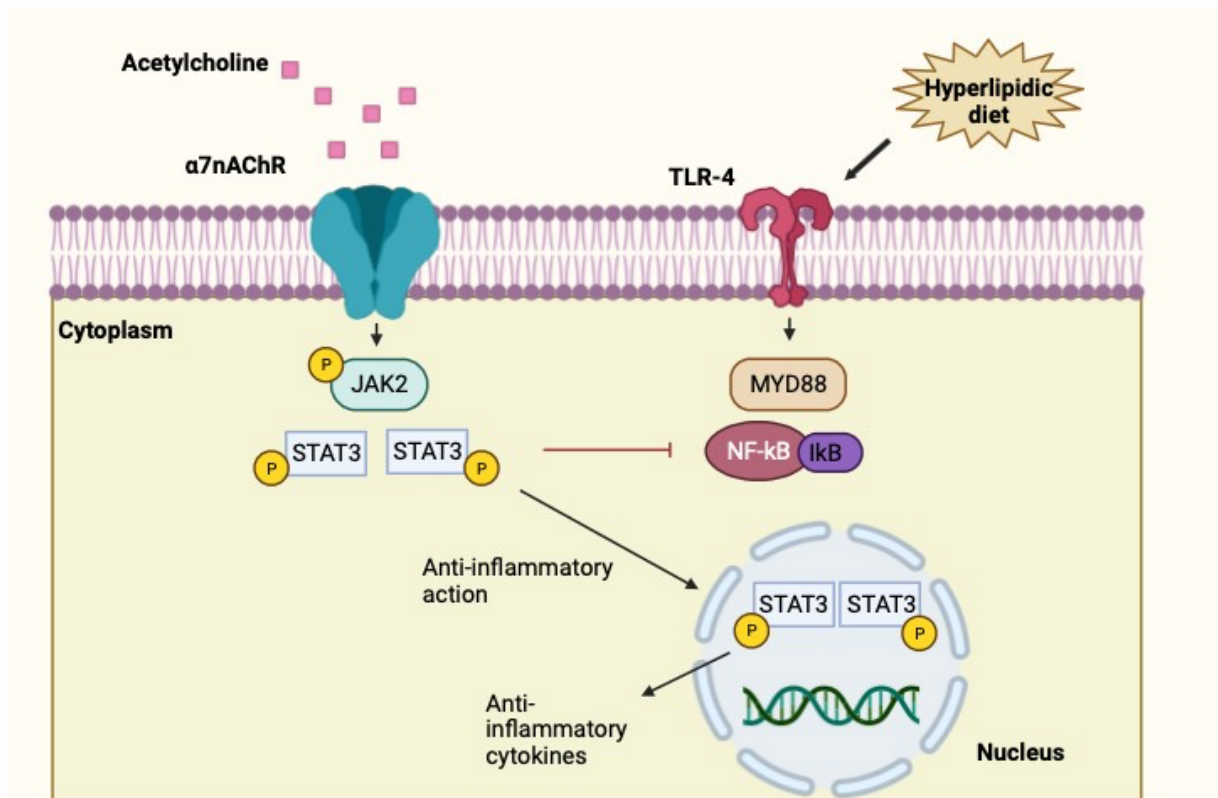


Fig. 3 Sinalização anti-inflamatória colinérgica mediada pelo receptor $\alpha 7$ nAChR. O consumo de dieta hiperlipídica induz liberação de mediadores inflamatórios através do NF- κ B. Porém a acetilcolina ativa o $\alpha 7$ nAChR, induzindo fosforilação de STAT3 (p-STAT3) via JAK2, que inibe a atividade de NF- κ B. STAT3 ativada age como fator de transcrição no núcleo, ativando a expressão de citocinas anti-inflamatórias.

No intestino, tecido alvo do nosso estudo, o nervo vago ativa diretamente os nervos mioentéricos (dentro da parede intestinal) para conduzir a produção de ACh e reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos no intestino (MATTEOLI et al., 2014; ROSAS-BALLINA et al., 2008) (Figura 4).

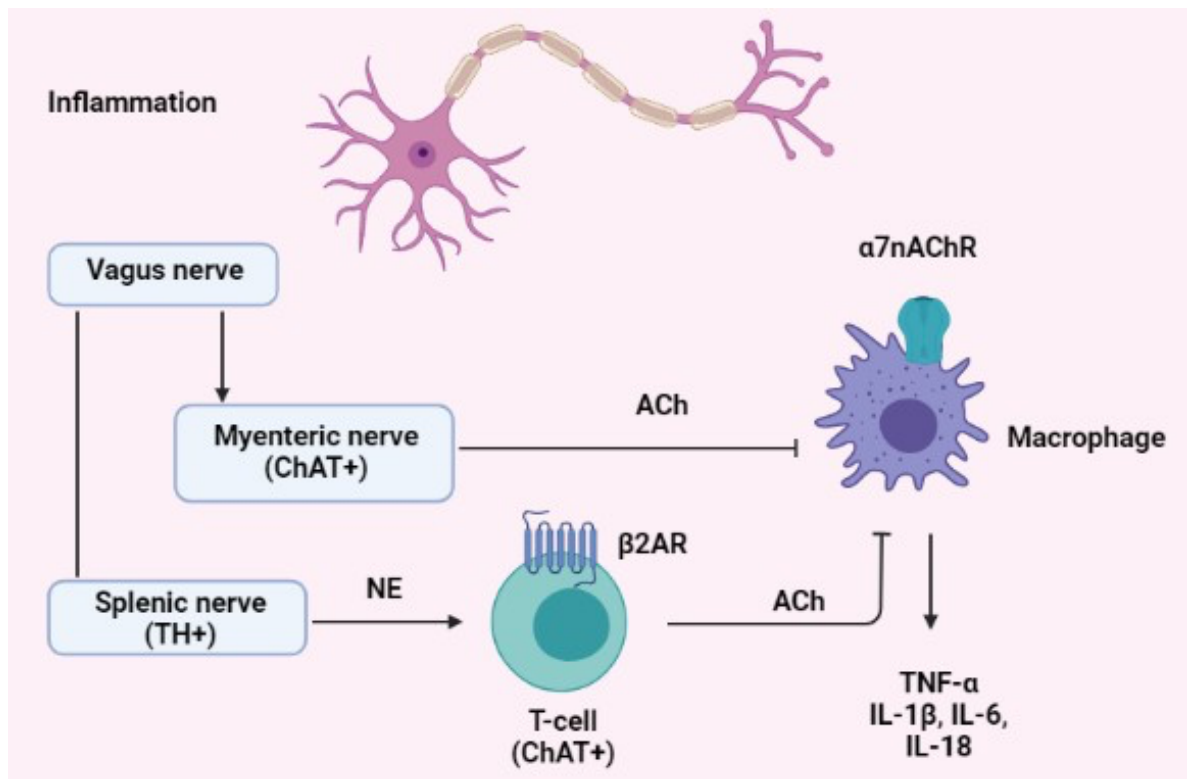


Fig 4. Via anti-inflamatória colinérgica. O nervo vago sinaliza para TH + nervos esplênicos, que secretam noradrenalina (NE) para ativar células T ChAT + para produzir acetilcolina (ACh), que sinaliza para macrófagos através do receptor $\alpha 7nAChR$ para reduzir a produção de citocinas pró-inflamatório. O nervo vago também ativa diretamente ChAT+ pelos nervos mioentéricos para produção de ACh para reduzir citocinas pró-inflamatórias de macrófagos no intestino (Adaptado: COCO CHU, 2020)

O papel do nervo vago em reduzir o processo inflamatório intestinal também foi observado em estudos clínicos. O estudo conduzido por BONAZ e colaboradores, com sete pacientes com doença de Crohn ativa, mostrou que a estimulação do nervo vago, através de manguito implantado com eletrodos, reduziu a atividade da doença e melhorou índices bioquímicos e endoscópicos (BONAZ, et al., 2016). Outro estudo, demonstrou pela primeira vez, após a esplenectomia, em modelo TNBS de colite experimental, uma diminuição do efeito protetor anti-inflamatório da estimulação

exógena de $\alpha 7nAChR$. Contudo, o tratamento com AR-R17779, agonista seletivo de $\alpha 7nAChRs$, exerceu efeitos benéficos em um modelo de colite sem a remoção do baço caracterizado pela ativação do sistema imune adaptativo, mediado por uma resposta de células T e que o baço é essencial para mediar essa proteção colinérgica (WAY et al., 2017).

1.4- Efeito da obesidade e consumo de HFD sobre a expressão de $\alpha 7nAChR$

A literatura tem mostrado que a expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ pode ser modulada por condições inflamatórias (MARTINS et al., 2021; QI et al., 2020; SOUZA et al., 2019). Um estudo do nosso grupo, em modelo animal, mostrou que o consumo de HFD por curto período (3 dias), resultou em significativa redução da expressão de $\alpha 7nAChR$ no hipotálamo (SOUZA et al., 2019), assim como demonstrado em macrófagos alveolares e intersticiais de camundongos obesos (QI et al., 2020). De maneira similar, também mostramos que a HFD, por curto período, foi capaz de reduzir a expressão do $\alpha 7nAChR$ em outros tipos celulares, como em células da medula óssea, efeito que foi prevenido pela suplementação com ácidos graxos insaturados (MARTINS et al., 2021).

Em outros modelos também têm sido demonstrados os efeitos do ambiente inflamatório sobre a expressão do $\alpha 7nAChR$. No estudo de Canello e colaboradores, os autores mostraram que a expressão de $\alpha 7nAChR$ é significativamente reduzida nos adipócitos de indivíduos humanos obesos (CANCELLO et al., 2012). Em outro estudo os autores demonstraram que o nível de expressão de $\alpha 7nAChR$ cerebral está diminuído na inflamação (HUA, S., EK, C.J., MALLARD, C., JOHANSSON, 2014), tanto na mitocôndria quanto na membrana plasmática cerebral (LYKHMUS, et al., 2015). Matsumura e colaboradores mostraram em camundongos transgênicos para proteína APP/PS1 que causa a doença de Alzheimer que a expressão do $\alpha 7nAChR$ microglial diminuiu gradualmente no hipocampo (MATSUMURA, et al., 2015). Finalmente, um estudo recente mostrou que a mucosa do íleo de pacientes com doença de Crohn tem redução significativa na expressão do $\alpha 7nAChR$, comparada aos indivíduos do grupo controle (DA SILVA, et al., 2020).

Portanto, a literatura nos sugere uma relação importante entre o consumo de dieta rica em gordura, a expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ e o processo inflamatório intestinal e na gênese da colite ulcerativa.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A relação entre obesidade e colite ulcerativa pode ser atribuída a vários fatores. A obesidade está associada a um estado inflamatório de baixo grau, caracterizado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias e alterações na microbiota intestinal. Essas substâncias inflamatórias podem reduzir os receptores $\alpha 7nAChR$, comprometendo sua resposta anti-inflamatória e agravando a inflamação no intestino em indivíduos com colite ulcerativa, contribuindo para a progressão da doença.

Desta maneira nós hipotetizamos que o consumo de dieta hiperlipídica prejudica a expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ e contribui para a piora do quadro inflamatório da colite.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo é avaliar se a expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ da mucosa intestinal no cólon é modulada pelo consumo HFD e a contribuição deste evento para a gravidade da colite ulcerativa em modelo animal de colite química induzida por DSS.

3.1-Objetivos específicos

- **Em modelo animal “wild type”, com uso de dieta controle e dieta experimental hiperlipídica (HFD).**
 - a. Identificar o tipo celular no intestino que expressa o receptor $\alpha 7nAChR$;
 - b. Avaliar o efeito do consumo de HFD sobre a expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ no intestino;
 - c. Avaliar o efeito do consumo de HFD sobre a expressão de proteínas de junção e a permeabilidade intestinal;
 - d. Avaliar a expressão intestinal do receptor $\alpha 7nAChR$ em modelo químico de colite induzida por DSS;
 - e. Avaliar a contribuição do consumo de HFD para a evolução clínica e o processo inflamatório da colite induzida por DSS;

- **Em modelos animais transgênicos com deleção do gene *Chrna7* $-/-$ (KO- $\alpha 7nAChR$), com uso de dieta controle e dieta experimental hiperlipídica (HFD)**
 - a. Avaliar a expressão de proteínas de junção;

- b. Avaliar o efeito do consumo de HFD sobre a expressão de proteínas de junção, a permeabilidade intestinal e o processo inflamatório no intestino;

4 METODOLOGIA

Utilizamos as seguintes linhagens de camundongos:

- i. Camundongos C57 selvagem com dieta controle e dieta experimental;
- ii. Camundongos KO- $\alpha 7nAChR$ ($Chrna7^{-/-}$): nocaute corpo inteiro para o receptor $\alpha 7nAChR$ com dieta controle e dieta experimental;

Foram utilizados 15 camundongos C57 selvagem/grupo e 5 animais KO $\alpha 7$ /grupo com 6 semanas de idade que, após a anestesia (Cetamina 300 mg/kg + Xilazina 30 mg/kg) por via intraperitoneal, foram eutanasiados por decapitação em guilhotina para a coleta de sangue. O soro foi obtido após centrifugação (805G/15min/25°C) do sangue que foi previamente mantido em temperatura ambiente (25°C) por 40 min. Os tecidos coletados foram: o cólon inteiro, tecidos adiposos (EPI, RET e mesentério) e hipotálamo. Foram rearranjados nos grupos de acordo com as questões e etapas descritas abaixo:

Grupo controle (CT): animais C57 recebendo dieta padrão (n=15).

Grupo HFD: animais C57 com dieta hiperlipídica (45%) durante 28 dias (n=15).

Utilizamos camundongos C57 selvagem que foram divididos em grupo controle (dieta padrão) e grupo HFD (dieta hiperlipídica 45%). O tempo de consumo de dieta foi de 4 semanas, para observar o menor tempo de consumo que induz redução da expressão do receptor no cólon. Em seguida, a partir da extração do cólon e isolamento das células epiteliais (IEC), foram utilizadas análises por WB (n=10), RT-qPCR (n=10), histologia (n=5) e imunofluorescência (n=5) para avaliar o efeito da HFD na expressão do receptor $\alpha 7nAChR$, de proteínas de junção e na permeabilidade intestinal.

Grupo controle + DSS (CT+DSS): animais C57 com dieta padrão e tratados com 2,5% de Dextran-Sulfato de Sódio (DSS) na água de beber por 7 dias (n=15).

Grupo HFD + DSS (HFD+DSS): animais C57 com dieta hiperlipídica (45%) e tratados com 2,5% de Dextran-Sulfato de Sódio (DSS) na água de beber por 7 dias (n=15).

Para responder essa questão camundongos C57 selvagem controle e previamente expostos a HFD foram desafiados com DSS (2,5%) na água de beber

por 7 dias. No período de desafio com DSS, parâmetros bem estabelecidos de progressão e gravidade da colite foram avaliados. Em seguida, a partir da extração do cólon e isolamento das células epiteliais (IEC), foram utilizadas análises por WB (n=10), RT-PCR (n=10), histologia (n=5) e imunofluorescência (n=5) para avaliar o efeito da associação da HFD e a colite experimental na expressão do receptor $\alpha 7nAChR$, de proteínas de junção e na permeabilidade intestinal e vias inflamatórias.

Grupo KO $\alpha 7$ + CT: animais com deleção do receptor $\alpha 7nAChR$ recebendo dieta controle (n=5).

Grupo KO $\alpha 7$ + HFD: animais com deleção do receptor $\alpha 7nAChR$ recebendo dieta hiperlipídica (45%) (n=5).

Utilizamos animais geneticamente modificados como descrito na metodologia. Dessa maneira este protocolo permitiu que os dados obtidos com os animais com deleção do receptor $\alpha 7nAChR$ sejam comparados com o efeito da dieta em camundongos *C57 wild type*. Os KO $\alpha 7$ consumiram a HFD por 4 semanas. No final, a partir da extração do cólon, foram realizadas análises por WB (n=5) e RT-PCR (n=5) para avaliar o efeito da associação da HFD na expressão de proteínas de junção e na permeabilidade intestinal e vias inflamatórias.

4.1- Caracterização do modelo experimental

4.1.1- Animais utilizados

Todos os procedimentos descritos neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP) sob protocolos de nº: 5751-1/2021 e 5386-1/2019.

Foram utilizados animais machos da linhagem *C57BL/6 (Wild Type)* com 6 semanas de vida (n= 15 animais/grupo) e obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP) em estantes ventiladas, com temperatura da sala de $21 \pm 1^\circ C$, ciclo claro/escuro de 12 horas e com água e ração *ad libitum*.

Os camundongos *Chrna7^{-/-} (B6.129S7-Chrna7^{tm1Bay}/J)* com background do *C57* foram obtidos do *Jackson Laboratory* nos EUA e mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas/UNICAMP.

O sucesso na alteração genética foi certificado através da genotipagem de cada animal. A genotipagem foi realizada logo após o desmame, utilizando *primers* específicos, de acordo com as instruções da THE JACKSON LABORATORY para cada linhagem (www.jax.org).

Os animais foram randomicamente distribuídos nos seguintes grupos experimentais, de acordo com a manipulação dietética:

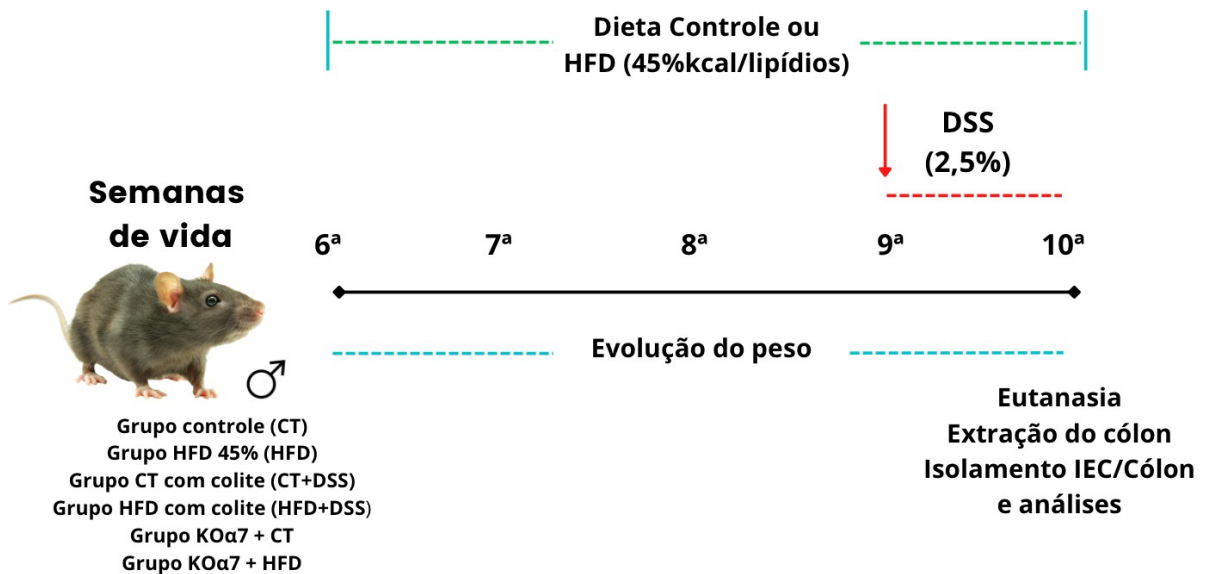


Figura 5 . Desenho experimental do presente estudo (Fonte: O autor, 2023).

4.2-Dieta experimental

A dieta ofertada aos animais durante 4 semanas foi preparada no laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA). A quantidade dos nutrientes e do valor calórico foi ajustada a partir de uma dieta controle, visando aumentar a densidade calórica e o fornecimento de lipídios, assim como sua fonte. Como produto final, foi obtida uma dieta hiperlipídica (45%) a partir da adição de fonte alimentar rica em gordura saturada (banha de porco). A composição da dieta hiperlipídica que foi utilizada durante os experimentos, assim como a comparação dos ajustes realizados a partir da dieta padrão é mostrado na tabela I.

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

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

4.3-Indução da colite por DSS e avaliação da atividade da doença.

A colite experimental foi induzida pela administração de 2,5% de DSS (m.w.=36,000-50,000) (MP Biomedicals) na água de beber por 7 dias. Durante o protocolo experimental da colite induzida pelo DSS os animais foram examinados diariamente em relação ao consumo alimentar, coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC = $(\text{PesoFinal} - \text{PesoInicial}) / \text{Kcal ingeridas}$) e ao índice de atividade da doença (IAD), medido de acordo com escores referentes à perda de peso corporal, consistência fecal e sangue nas fezes (GHIA, J. E., BLENNERHASSETT, P., AND COLLINS, 2008; GHIA, J. E., GALEAZZI, F., FORD, D. C., HOGABOAM, C. M., VALLANCE, B. A., AND COLLINS, 2008).

Tabela 2. Sistema de Pontuação para Calcular o Índice de Atividade da Doença (IAD).

Escala	Perda de Peso	Consistencia das Fezes	Presença de Sangue nas Fezes
0	Não	Normal	Não
1	1-5%	Normal	Não
2	6-10%	Amolecidas	Sangramento leve
3	11-20%	Amolecidas	Sangramento leve
4	>20%	Diarreia	Sangramento Intenso

O valor do IAD foi calculado através da soma da pontuação para perda de peso, consistência das fezes e a presença de sangue nas fezes. IAD: Índice de Atividade da Doença.

4.4-Isolamento de Células Epiteliais Intestinais (IEC)

IECs foram isoladas do cólon de camundongos C57 selvagem com dieta controle e HFD. Resumidamente, os cólons foram abertos longitudinalmente, lavados três vezes com tampão fosfato (PBS) gelado, aproximadamente 8°C e cortados em minúsculos fragmentos. IEC foram isoladas usando 2 mM EDTA/HBSS a 37°C com agitação durante 60 min. Os tubos foram agitados em vórtex por 20 segundos a cada 10 minutos. O material foi então filtrado através de um filtro de células de 70 µm (431751-CORNING), em seguida, centrifugou-se a 780-800G por 10min a 4°C e descartou-se o sobrenadante. O pellet de células, foi lavado uma vez com 20 mL de salina 0,9% em PBS, então ressuspendidas em 1 mL de PBS e posteriormente contadas em câmara de Neubauer. Para os procedimentos abaixo, foi padronizada a utilização de 2×10^6 células (FELLOWS et al., 2018).

4.5-Análise da expressão gênica

4.5.1-Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.

Para avaliação da quantidade de transcrito de RNAm foi empregada a técnica de real-time PCR (RTq-PCR). Para isso, o RNAm total foi extraído com o método de Trizol em tecido e kit Phenol-free Total RNA Purification no IEC e utilizou-se DNase I, RNase-free (EN0521, ThermoFisher) (IEC). A quantidade de RNA das amostras foi determinada por espectrofotometria a 260nm (A260) e a 280nm (A280), e a integridade do RNA isolado foi determinada pelo gel de integridade e pela razão A260:A280.

Em seguida, o cDNA foi sintetizado usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). A expressão relativa foi determinada usando os seguintes primers: SIRT1(Mm00490758_m1 da marca ThermoFisher SCIENTIFIC), CHRNA7 (Mm01312230_m1 da marca ThermoFisher SCIENTIFIC), TNF α (Mm00443258_m1 da marca ThermoFisher SCIENTIFIC), IL-1B (Mm00434228_m1 da marca ThermoFisher SCIENTIFIC), IL-10 (Mm01288386_m1 da marca ThermoFisher SCIENTIFIC), Occludin (Mm00500912_m1 da marca ThermoFisher SCIENTIFIC), Tjp1(ZO1)(Mm01320638_m1 da marca ThermoFisher SCIENTIFIC), Claudina-1 (Mm01342184_m1 da marca ThermoFisher SCIENTIFIC) e Claudina-4 (Mm00515514_s1 da marca ThermoFisher SCIENTIFIC); e como endógeno utilizou-se ACTB (4351315 da marca Applied Biosystems), com sistema de detecção TaqMan

para os genes alvo. A qRT-PCR foi realizada na plataforma ABI Prism 7500. Os dados obtidos foram analisados usando o Sistema de Detecção de Sequência 1.7 (Applied Biosystems). Os níveis de expressão relativa dos genes-alvo foram calculados pelo método $\Delta\Delta Ct$.

4.6-Avaliação da quantidade e fosforilação das proteínas

4.6.1-Expressão proteica por Western blotting

Para extrair o conteúdo proteico do IEC foi utilizado um tampão de lise, o conteúdo proteico obtido do processamento do IEC foi dosado através do método de *BCA protein assay kit* (23225; Thermo Fisher Scientific) e o conteúdo do tecido (cólon) foi dosado através do método de Biureto e posteriormente diluído em tampão de Laemmli. Após rápida fervura, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação de proteínas por eletroforese (SDS-PAGE). Proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose e os resultados foram avaliados através do blotting com os seguintes anticorpos específicos: pSTAT3 (Tyr705, #9145) da marca Cell Signaling®, MyD88 (sc-74532) da marca Santa Cruz Biotechnology®, $\alpha 7nAChR$ da marca Bioss Antibodies® (bs-1049R), SIRT1, Ocludina (33-1500), ZO-1 (61-7300), Claudina 1(ab15098) e Claudina 2 (ab53032) da marca ABCAM®, como endógeno utilizou-se vinculin (139015). Foram utilizados secundários Rabbit e Mouse da marca KPL®. O sinal foi detectado por quimioluminescência com kit ECL da Amersham em sistema de detecção automatizado. A intensidade das bandas foi quantificada usando o software *Scion Image*.

4.6.2-Imunofluorescência

Os animais foram perfundidos com paraformaldeído a 4% (pH = 7,4), os tecidos extraídos e mantidos em solução de sacarose 40%. Em seguida foram rapidamente congelados em *tissue tek* diretamente no criostato e as secções (10 micrometros) obtidas. Após o corte, os tecidos foram colocados em lâminas e congelados a $-20^{\circ}C$. Os cortes foram circundados com caneta hidrofóbica, bloqueados com albumina e em seguida, incubados com anticorpo primário overnight. Posteriormente, após a lavagem foi realizado a incubação com anticorpo secundário por 90 min. Utilizou-se DAPI como

marcador nuclear. Os cortes foram avaliados quanto à distribuição da proteína de interesse: F4-80 no tecido usando os anticorpos conjugados com fluoróforos e posterior análise por microscopia confocal (FACHI et al., 2019).

4.7-Medida de permeabilidade intestinal

Os camundongos foram submetidos ao jejum de 12 horas, sendo que ao final da 8ª hora os animais não receberam a oferta de água. Então, através da gavagem oral, foram administrados 25 mg/100 g de peso corporal de isotiocianato de fluoresceína (FITC)-dextrano (FD40- Sigma-Aldrich) (ESHELMAN et al., 2019). Após 4 horas, os camundongos foram sacrificados e amostras de sangue foram rapidamente coletadas por decapitação. O sangue foi deixado coagular por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro e coletado em eppendorf envolto em papel alumínio. O soro foi isolado por centrifugação (805G/15min) e diluído em PBS (1:2). A concentração de FITC-dextrano foi medida usando um fluorômetro (BioTek, Synergy 2) (comprimento de onda de excitação, 485 nm; comprimento de onda de emissão, 528 nm).

4.8-Dosagem de atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido.

A dosagem de atividade da MPO foi usada como marcador bioquímico de infiltração de granulócito no tecido intestinal. Resumidamente, um fragmento do tecido foi homogeneizado em 1,9 ml de buffer 1 de NaCl refrigerado para cada 100 mg de tecido. Após homogeneização e centrifugação o *pellet* foi ressuspenso no buffer 2 de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) em temperatura ambiente, na proporção de 1,9ml/100mg de amostra. Alíquotas de 1ml da suspensão foram congeladas e descongeladas por 3x em nitrogênio líquido. A absorbância em 450 nm avaliada usando 0,002% de H₂O₂ e o H₂SO₄ (1M). Cálculo da atividade da MPO: N° neutrófilos = (média x 2) + 0,0055/0,0022. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x10⁵ (BRADLEY, P. P., CHRISTENSEN, R. D., AND ROTHSTEIN, 1982).

4.9-Avaliação histológica do cólon

O cólon foi coletado, lavado em PBS e os tecidos extraídos foram mantidos em solução de sacarose 40%. Em seguida foram rapidamente congelados em Tissue tek da marca *Fisher HealthCare* diretamente no criostato e as secções obtidas. Após os

cortes de 10 μ M foram corados com H&E para avaliação histológica. A avaliação do grau de comprometimento do tecido foi realizada de acordo com a infiltração celular: o aumento do número de células inflamatórias na lâmina própria foi classificado como 1; a confluência de células inflamatórias que se estendem para a submucosa como 2 e a extensão transmural do infiltrado como 3. Os danos ao tecido foram classificados como: erosões linfoepiteliais discretas como 1; erosões da mucosa como 2 e extenso dano à mucosa e / ou extensão através de estruturas mais profundas do intestino parede como 3. Os dois subescores igualmente ponderados foram adicionados e a pontuação histológica da gravidade da colite foi de 0 a 6 (DIELEMAN, L. A., 1998; SHAO et al., 2019).

4.10-Análise Estatística

Os resultados foram apresentados em média e erro padrão da média. Para as análises estatísticas, os dados foram verificados quanto à distribuição normal usando o teste Shapiro-Wilk. O teste de Levene foi realizado para verificar a igualdade das variâncias. Entre dados quantitativos como homocedasticidade, distribuição normal e independente, foi realizado o teste t *Student* para avaliação da média entre dois grupos. Para a comparação de médias entre três grupos ou mais, foi utilizada análise de variância One- way ANOVA e Two-way ANOVA seguido pós-teste de Bonferroni, de acordo com os grupos. Quando necessário teste de Tukey HSD para comparação múltipla de médias. Os dados considerados não paramétricos foram analisados através dos testes de *Mann-Whitney* ou *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn*. Em todos os casos o nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prisma, versão 5.01, onde foram realizados a confecção dos gráficos.

5 RESULTADOS

5.1-A expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ e do $TNF-\alpha$ em células epiteliais intestinais isoladas está reduzida em camundongos que consumiram dieta hiperlipídica.

Ao avaliar se o consumo da dieta hiperlipídica durante 4 semanas leva a alterações na expressão do receptor $\alpha 7nAChR$, tanto em células epiteliais isoladas do cólon (IEC), quanto no tecido, observamos que camundongos com HFD apresentaram redução na expressão gênica de *Chrna7* (57,81%) (Fig.1 A), bem como uma diminuição da expressão gênica de *TNF- α* (55,1%) (Fig.1 C) em IEC, comparados a camundongos com dieta controle. Entretanto no cólon todo não foi observada diferença significativa entre os grupos (Fig.1 B e D).

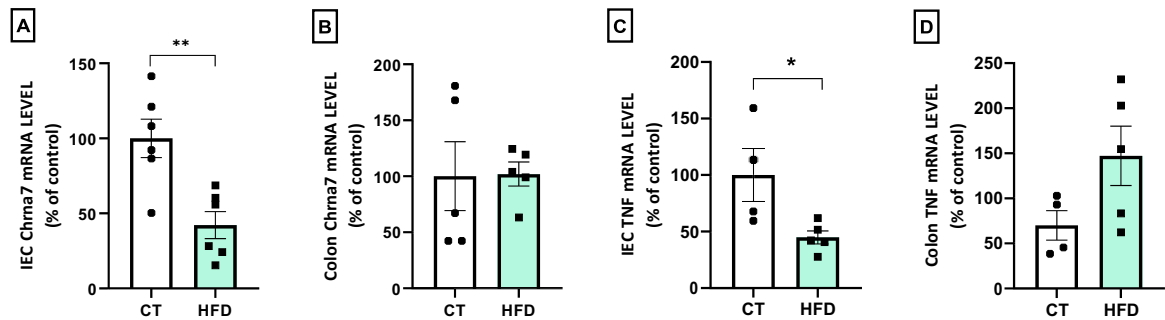


Figura 1. Expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ e *TNF* em células epiteliais isoladas do cólon de camundongos que consumiram dieta hiperlipídica (HFD) ou dieta controle (CT) (A) Nível de RNAm (qRT-PCR) de *Chrna7* em IEC do cólon, (B) Nível de RNAm (qRT-PCR) de *Chrna7* no cólon, (C) Nível de RNAm (qRT-PCR) de *TNF α* no IEC do cólon e (D) Nível de RNAm (qRT-PCR) de *TNF α* no cólon. O gene *ACTB* foi usado como controle endógeno. Resultados apresentados como média \pm E.P.M. Teste t-student, * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$.

5.2-A expressão genica das proteínas de junção da barreira intestinal, *TJP1* e *Ocludina*, está reduzida nos camundongos que consumiram dieta hiperlipídica.

Ao avaliar se o consumo da dieta hiperlipídica durante 4 semanas leva a alterações na expressão genica das proteínas de junção da barreira intestinal em células epiteliais isoladas do cólon, observamos que camundongos com HFD apresentaram redução na expressão gênica para *Tjp1* (35%) (Fig.1 A) e *Ocludina* (25,27%) (Fig.1 B), comparados a camundongos com dieta controle. Entretanto a expressão gênica de *Cld4* e *Cld1* não mostrou diferença significativa entre os grupos (Fig.1 C e D).

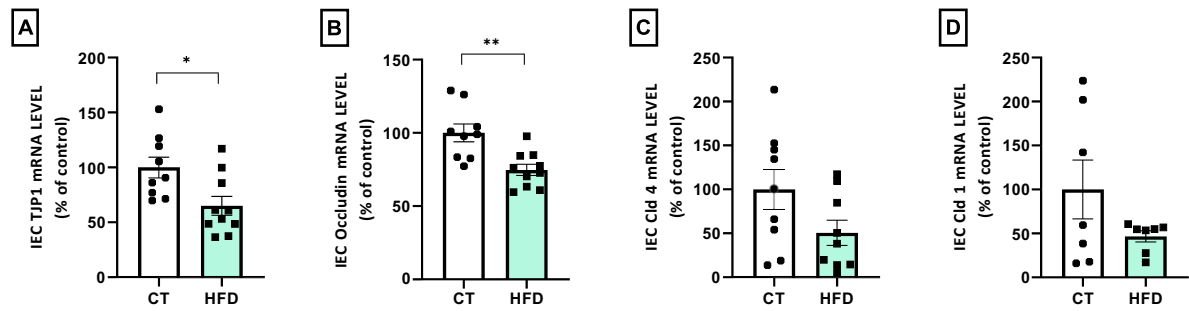


Figura 2. Expressão gênica das proteínas de junção no isolamento de células epiteliais do cólon nos camundongos que consumiram dieta hiperlipídica e controle. (A) mRNA level (qRT-PCR) de Tjp1 no IEC do cólon, (B) mRNA level (qRT-PCR) de Occludin no IEC do cólon, (C) mRNA level (qRT-PCR) de Cld 4 no IEC do cólon e (D) mRNA level (qRT-PCR) de Cld 1 no IEC do cólon. N=10/grupo. O ACTB foi usado como controle endógeno. Resultados apresentados em média \pm E.P.M. Teste t-student, * $p \leq 0,05$, ** $p < 0.01$.

5.3-A dieta hiperlipídica atenuou o escore do índice de atividade da doença (DAI) de colite induzida por DSS em camundongos.

Ao investigar o efeito da dieta hiperlipídica na colite induzida por DSS, o grupo CT+DSS apresentou perda de peso quando comparado com o grupo CT (22,54%), assim como o grupo HFD+DSS comparado ao grupo HFD (13,82%). Comparando os grupos tratados com DSS, o grupo com dieta CT obteve maior perda de peso em relação ao grupo HFD (Fig. 3 A). O grupo CT+DSS apresentou maior escore DAI comparado ao grupo HFD+DSS, no 4º e 7º dia (Fig. 3B). Animais tratados com DSS apresentaram diarreia e perda de peso a partir do 4º ou 5º dia de tratamento, evidenciando no 5º dia o sangramento retal (Fig. 3 B). Analisando o peso corporal durante os 7 dias de indução da colite, o grupo HFD ganhou peso até o 5º dia e depois começou a perder, enquanto os camundongos controle começaram a perder peso um dia antes do grupo HFD (Fig. 3 C). Essa diferença na perda de peso foi de 4,88% entre os grupos, demonstrada no gráfico de barras (ig. 3 D). No consumo alimentar não houve diferença significativa entre os grupos (Fig.3 E). Por se tratar de dietas de densidade energética diferente, avaliou-se o coeficiente do ganho de peso por consumo calórico, com maior diferença significativa desde o 2º ao 6º dia do tratamento com DSS para o grupo HFD (Fig.3 F). Esses resultados revelam que a dieta hiperlipídica diminui o escore do DAI de colite e que esses animais receberam maior aporte calórico.

Avaliamos a adiposidade e o peso do baço, um dos órgãos que participa da resposta contra a infecção. O grupo HFD apresentou maior deposição de gordura nos coxins retroperitoneal e epididimal comparado aos grupos CT e HFD+DSS (Fig.3 G e H). Comparando os grupos tratados com DSS, o grupo HFD+DSS teve aumento da deposição no coxim epigonadal em relação ao CT+DSS (Fig.3 H). O mesentério mostrou redução nos grupos com DSS independente das dietas e o baço teve aumento significativo no grupo CT+DSS comparado ao grupo controle (Fig.3 I e J).

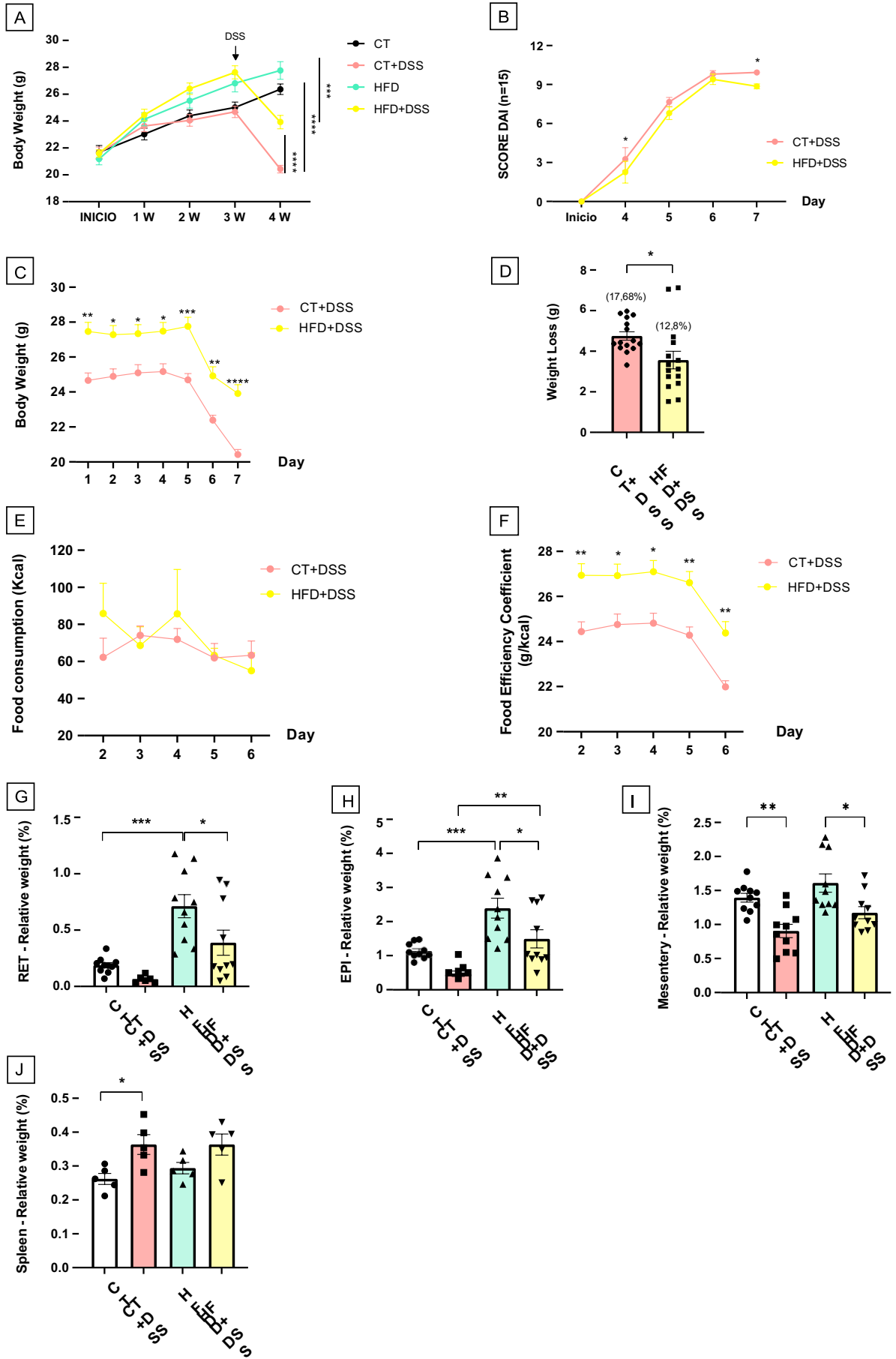


Figura 3. Escore do índice de atividade da doença (DAI) de colite induzida por DSS em camundongos alimentados com dieta controle ou HFD. (A) Peso Corporal (g), (B) Escore do índice de atividade da

doença de colite (DAI), (C) Peso corporal na indução da colite (g), (D) Perda de peso (g), (E) Consumo alimentar (Kcal), (F) Coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (g/kcal), (G) Peso relativo (%) do RET, (H) Peso relativo (%) do EPI, (I) Peso relativo (%) do Mesentério, (J) Peso relativo (%) do baço. Os resultados estão expressos em média \pm E.P.M. Two-way ANOVA e One-way ANOVA, * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.4-O consumo de dieta hiperlipídica por quatro semanas promove o encurtamento do cólon e aumenta a permeabilidade paracelular do cólon na colite.

Ao avaliar se a dieta hiperlipídica e a colite levam a alterações no comprimento e na permeabilidade intestinal do cólon observamos que o grupo HFD e o CT+DSS apresentaram um encurtamento significativo do comprimento do cólon quando comparados ao CT, assim como no grupo HFD+DSS comparado ao grupo HFD (Fig.4 A). Na análise da permeabilidade, o grupo HFD+DSS apresentou maior intensidade de fluorescência no soro (FITC dextran) normalizada pelo comprimento do cólon (cm), quando comparado aos grupos CT+DSS e HFD (Fig.4 B).

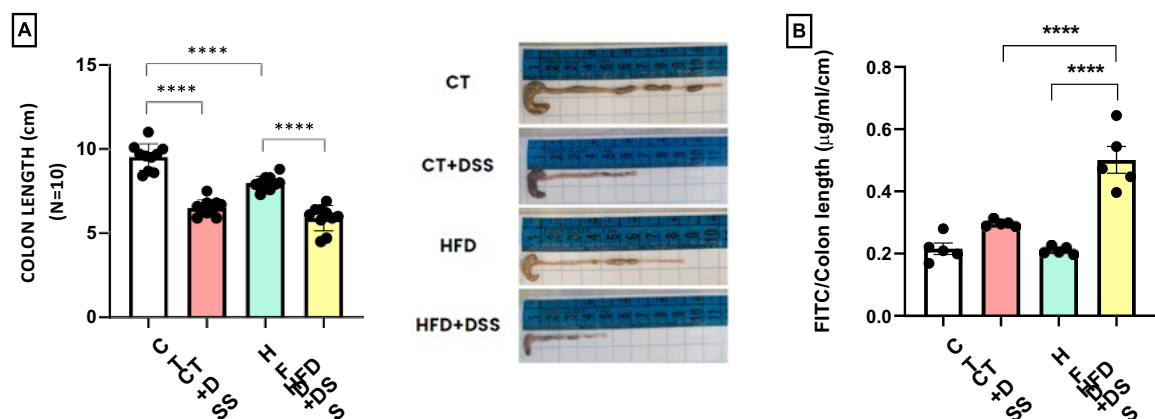


Figura 4. Comprimento e permeabilidade do cólon na colite. (A) Comprimento do cólon e imagens representativas do cólon, (B) intensidade de fluorescência sérica (FITC dextran) pelo comprimento do cólon ($\mu\text{g}/\text{ml}/\text{cm}$). Os resultados estão expressos média \pm E.P.M. ANOVA, * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.5- A colite induzida por DSS levou ao agravamento da infiltração inflamatória do cólon em camundongos, independente da dieta.

Os animais com colite induzida por DSS apresentaram um agravamento da infiltração de células inflamatórias (indicado pelas setas pretas) e erosões na mucosa (indicado pelas setas vermelhas), como demonstrado nas imagens de cortes

histológicos (Fig.5 A), bem como representado no escore histológico da doença de colite (Fig.5 B). Na fig. 5C é apresentado a imunofluorescência para F4/80 com a finalidade de marcar macrófagos no cólon. Como pode ser observado, esta análise inicial sugere que ocorre o aumento de células F4/80+ no grupo HFD+DSS, comparado aos outros grupos avaliados (Fig.5 C). Ao avaliar o estado de inflamação no colón, observamos que os níveis de atividade da mieloperoxidase foram significativamente acentuados no grupo com DSS+HFD, quando comparado com os grupos HFD e DSS+CT (Fig.5 D).

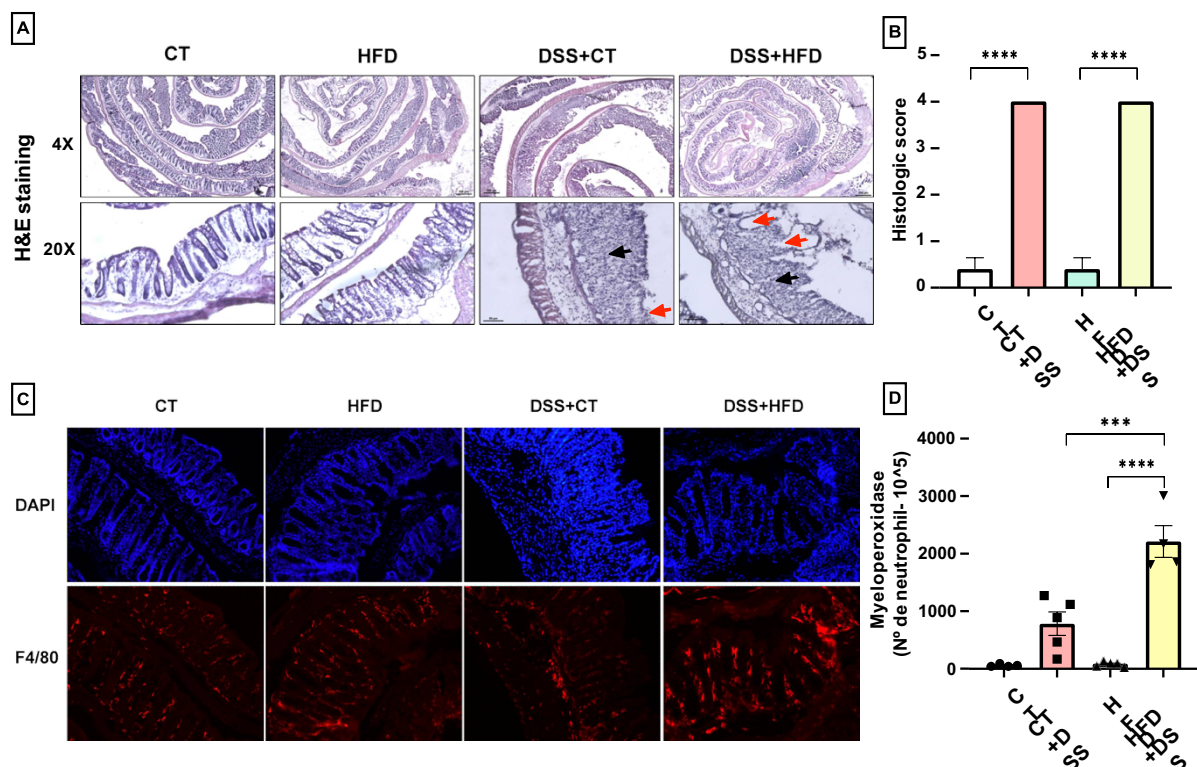


Figura 5. Análise Histológica, Imunofluorescência e atividade da Mieloperoxidase do cólon de camundongos. (A) Imagem da análise histológica, (B) Escore histológico da colite e (C) Imagem representativa de macrófagos F480 e (D) Atividade da Mieloperoxidase (nº de neutrófilos – 10⁵). N=5/grupo. Os resultados estão em média ± E.P.M., foram representados por barras verticais. ANOVA, *p ≤ 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001

5.6-A expressão de proteínas de junção da barreira intestinal e de $\alpha 7nAChR$ em IEC do cólon é afetada pelo consumo de HFD e pelo DSS.

O consumo da dieta hiperlipídica reduziu a expressão proteica de $\alpha 7nAChR$ (58,84%), Claudina1 (38,69%), Claudina 2 (44,33%) e Ocludina (46,32%) (CT x HFD) em IEC do cólon (Fig. 6 A, B, C e D). Além disso, o consumo de HFD potencializou o efeito do DSS na expressão das proteínas de junção, enquanto o DSS em animais

HFD reduziu a quantidade de ZO1 (36,58%) e Sirt1 (35,89%) quando comparado com CT+DSS (Fig. 6 E e F). Esses resultados mostram que a dieta hiperlipídica aumentou a gravidade das alterações estruturais da barreira intestinal desencadeadas pelo DSS.

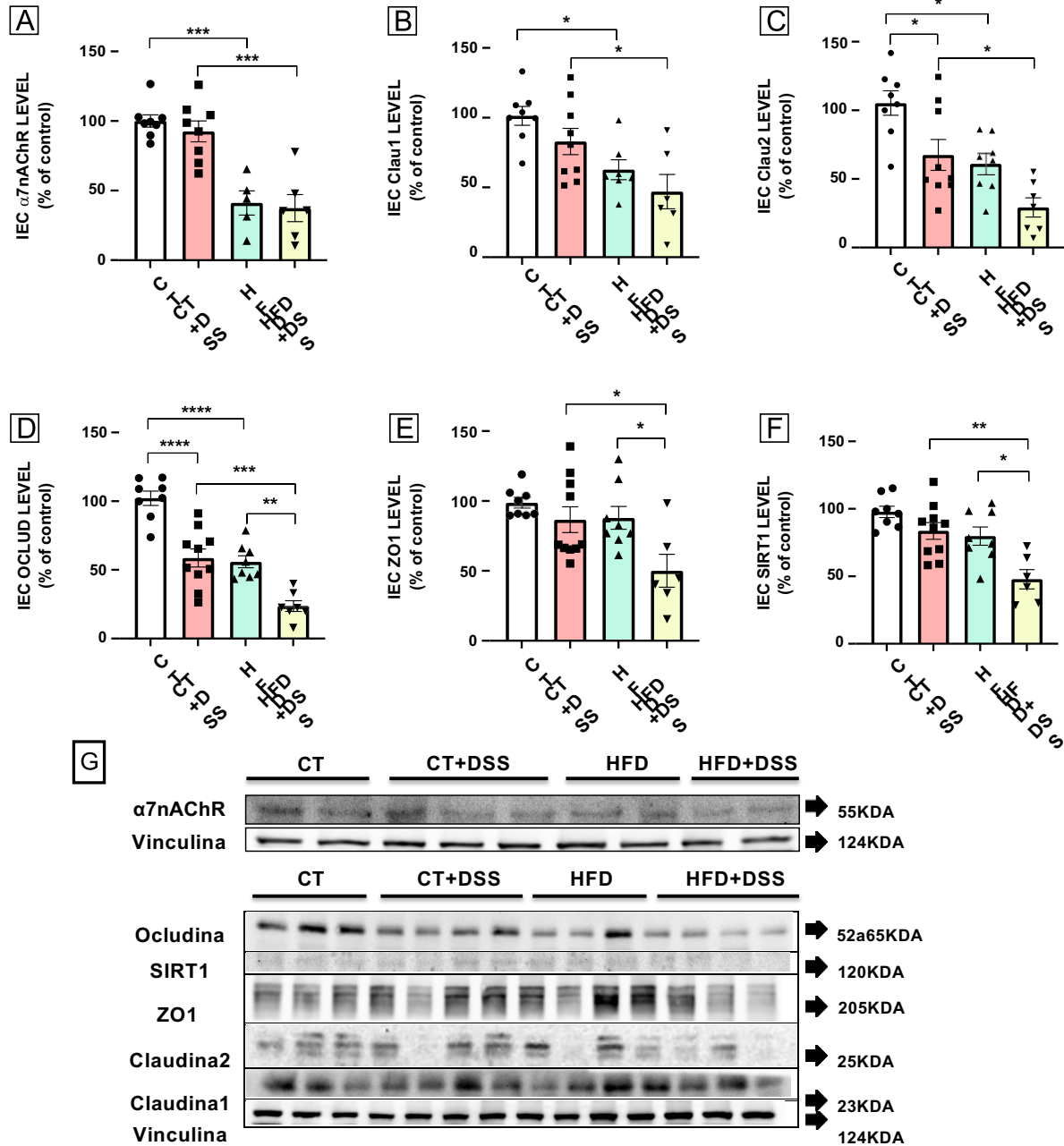


Figura 6. Níveis das proteínas da barreira intestinal, SIRT1 e de $\alpha 7nAChR$ no IEC do cólon. (A) Nível de proteína $\alpha 7nAChR$ em IEC, (B) Nível de proteína Claud1 em IEC, (C) Nível de proteína Clau2 em IEC, (D) Nível de proteína OCLUD em IEC, (E) Nível de proteína ZO-1 em IEC, (F) Nível de proteína SIRT1 em IEC e (G) Imagem representativa da técnica Western blot. Análises de Western blot e a quantificação realizada IEC do cólon de n=10/grupo. Os resultados estão em média \pm erro padrão da média. ANOVA, * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.7- Os animais KO α 7 que consumiram dieta hiperlipídica por 4 semanas, apresentaram diminuição do comprimento do cólon.

O comprimento do cólon não é modificado pela deleção do receptor α 7nAChR por si só, (WT+CT vs KO α 7+CT). No entanto, o comprimento do cólon foi significativamente reduzido quando os camundongos (WT e KO α 7) consumiram HFD (Fig.7 A), como pode ser observado na imagem representativa (Fig.7 B). Em relação ao peso corporal, os animais KO α 7+CT mostraram ganhar menos peso comparado ao grupo WT+CT e o mesentério teve redução nos grupos com KO α 7 independente das dietas (Fig.7C e D).

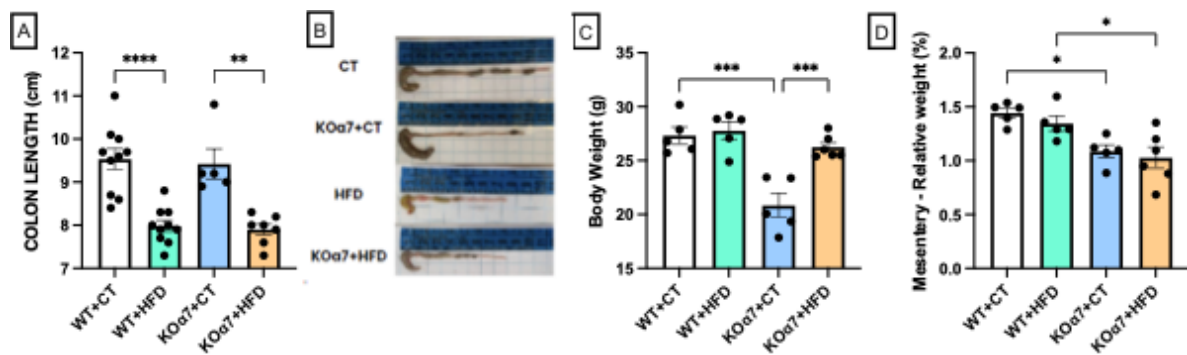


Figura 7. Comprimento do cólon de camundongos WT e KO α 7, alimentados com dieta CT ou HFD. (A) Comprimento do cólon entre os animais WT e KO α 7 e (B) Imagens representativas do cólon, (C) Peso Corporal (g) e (D) Peso relativo (%) do Mesentério. N=5/grupo. Os resultados estão em média \pm E.P.M., foram representados por barras verticais. ANOVA, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.8- O cólon dos animais KO α 7 que consumiram dieta hiperlipídica por 4 semanas apresentou redução da expressão de Claudina4, Claudina1 e Tjp1.

A dieta HFD reduziu (51,37%) a expressão de Claudina4 (Fig.8A) e aumentou (142,7%) claudina1 (Fig.8 B) em animais WT. A deleção do receptor α 7 (KO α 7) não promoveu mudança da quantidade de nenhuma proteína de junção avaliada, mas a associação com a HFD impediu o aumento de claudina1. Entretanto o mesmo grupo apresentou redução da expressão de Claudina1, comparada ao grupo WT+HFD que teve um aumento significativo quando comparado ao grupo WT+CT (Fig.8 B). Em relação a expressão de Ocludina, não houve diferença significativa entre os grupos (Fig.8 C). A expressão gênica de Tjp1 (ZO1) mostrou uma redução no grupo KO α 7+HFD comparado com os grupos KO α 7+CT e WT+HFD (Fig.8 D).

Também avaliamos a expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL10 e o resultado não mostrou diferença significativa entre os grupos (Fig.8 E).

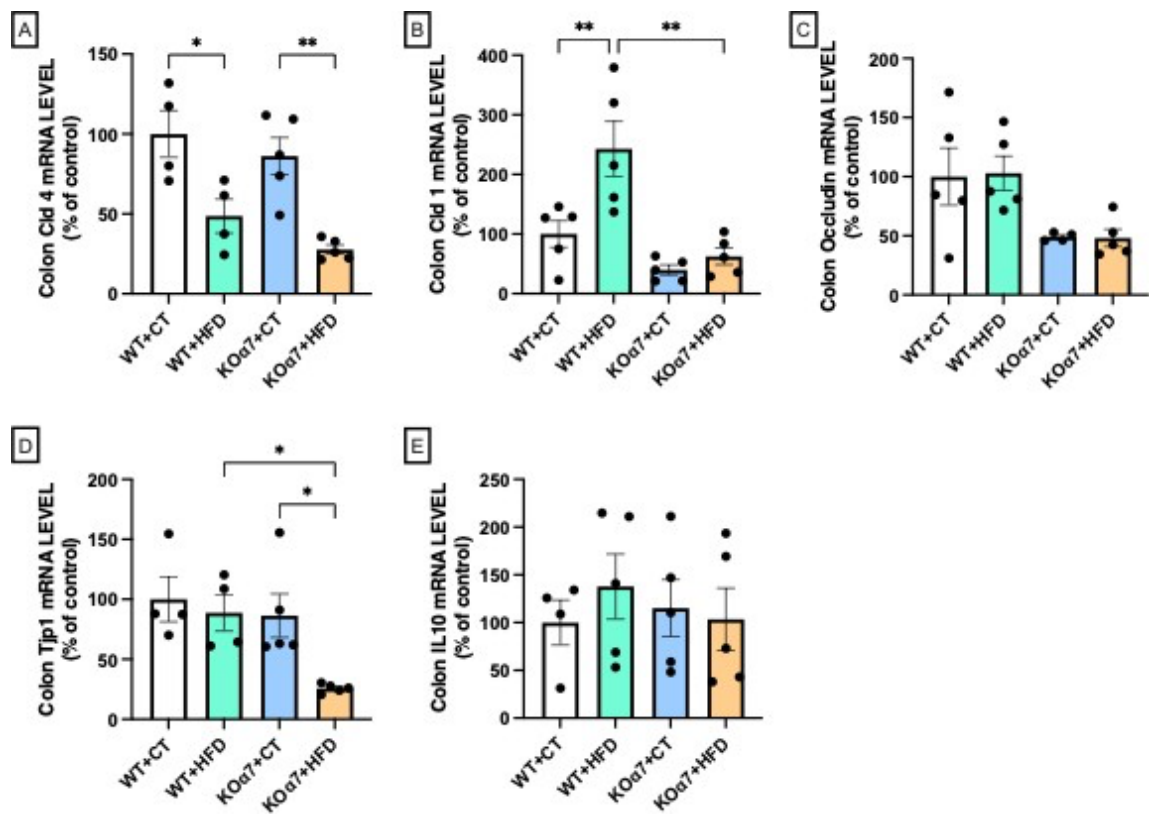


Figura 8. Expressão gênica das proteínas de junção e IL10. (A) mRNA level (qRT-PCR) de Cld4 do cólon, (B) mRNA level (qRT-PCR) de Cld1 do cólon, (C) mRNA level (qRT-PCR) de Occludin do cólon, (D) mRNA level (qRT-PCR) de Tjp1 do cólon e (E) mRNA level (qRT-PCR) de IL10 do cólon. N=5/grupo. O ACTB foi usado como controle endógeno. Resultados apresentados em média ± E.P.M. ANOVA, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

5.9- Animais KOα7 alimentados com dieta controle apresentaram aumento dos níveis proteicos de ZO1, Ocludina e Claudina2 no cólon, enquanto animais KOα7 alimentados com dieta hiperlipídica por 4 semanas apresentaram redução de Claudina2.

Os camundongos KOα7 apresentaram diferença significativa da expressão das proteínas de junção do cólon comparados ao grupo WT, ambos com dieta controle. O animal knockout α7 mostrou níveis proteicos de ZO1 (142%), Ocludina (163%) e Claudina2 (234%) maiores, comparado ao WT (Fig.9 A, B e C). Entretanto no grupo KOα7+HFD os níveis proteicos de Claudina2 (230%) foram reduzidos no cólon, comparado com os animais KOα7+CT (Fig.9 C). Contudo, os níveis proteicos da

Claudina1 não foram significativamente diferentes entre os grupos (Fig.9 D), como pode-se observar na imagem representativa (Fig.9 E).

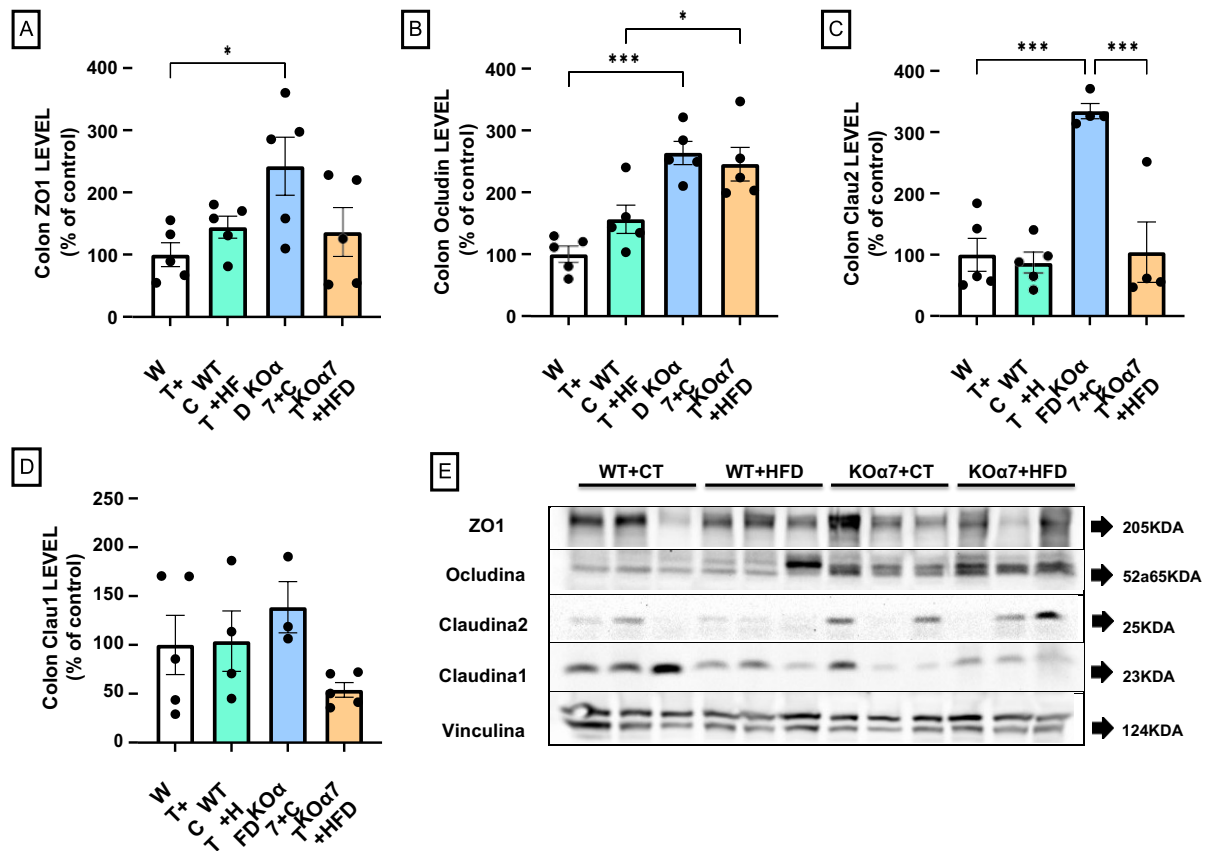


Figura 9. Níveis das proteínas ZO1, Occludina, Claudina2 e Claudina1 no cólon de camundongos WT e KOα7 com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 4 semanas. (A) Nível de proteína ZO1 no cólon, (B) Nível de proteína Occlud no cólon, (C) Nível de proteína Claud2 no cólon, (D) Nível de proteína Claud1 no cólon, (E) Imagem representativa das bandas de proteína no cólon. N=5/grupo. Análises de Western blot e a quantificação realizada do cólon de camundongos. One-way ANOVA e Teste t-student, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ****p < 0.0001.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, é bem claro o papel que o processo inflamatório tem na disfunção da barreira intestinal (CAPALDO; NUSRAT, 2009; CHELAKKOT; GHIM; RYU, 2018; LI et al., 2010; MARCHIANDO et al., 2010; WANG et al., 2005) e no desenvolvimento de patologias inflamatórias intestinais.

O consumo de HFD promove alteração na integridade da barreira, promovendo processos inflamatórios que podem estar associados as DII. Neste estudo procuramos investigar o papel do receptor $\alpha 7nAChR$ nos efeitos da HFD sobre a integridade da barreira intestinal e sua permeabilidade. O processo inflamatório é um importante componente do desenvolvimento de DII e, tanto a dieta HF, como o receptor $\alpha 7nAChR$ têm papel amplamente conhecidos na modulação de processos inflamatórios (MARTINS et al., 2021; SOUZA et al., 2019)

O consumo de dieta HF por 4 semanas afeta a expressão do receptor $\alpha 7nAChR$, das proteínas de barreira (Tjp1 e occludina) e da citocina inflamatória TNF α nas células epiteliais isoladas (IEC) do cólon de camundongos. Embora não tenhamos identificado aumento do nível de RNAm para TNF- α , a HFD está alterando a expressão de proteínas importantes para a manutenção da integridade da barreira.

Adicionalmente, a análise por *western blot* mostra que a quantidade das proteínas claudina-1, claudina-2, ocludina e ZO-1 nas células epiteliais do cólon foi reduzida, sugerindo que o consumo de HFD pode estar associado a danos na integridade da barreira intestinal. Estudos *in vitro* realizados com células Caco-2 mostraram que mediadores inflamatórios danificaram as proteínas de junção firme (AL-SADI et al., 2008; GUO et al., 2012; YE; MA; MA, 2006). Os autores sugerem que este efeito foi decorrente da ativação de NF- κB e a interação com a região promotora da proteína MLCK (*myosin light chain kinase*) com consequente fosforilação da miosina de cadeia leve, danos para as proteínas de junção firme e aumento da permeabilidade paracelular (GUO et al., 2012; RANAIVO et al., 2007).

Estudos realizados por Shao e colaboradores mostraram que a deficiência no receptor $\alpha 7nAChR$ contribui para o aumento da reação inflamatória em modelos de colite induzida por DSS e agrava a DII (SHAO et al., 2019). Recentemente, outro estudo também mostrou que a administração de GTS-21, um agonista seletivo de $\alpha 7nAChR$, tanto *in vivo*, como *in vitro* aumentou a expressão de proteínas TJ. Além disso, GTS-21 também inibiu a ativação de NF- κB em células epiteliais intestinais (IEC) e em modelo de colite (YE et al., 2022), um evento importante associado ao processo inflamatório. Interessantemente, o consumo de HFD foi capaz de reduzir a expressão de proteínas

associadas a junções, claudina-1 e ocludina no cólon (KIM et al., 2012). Assim, nossos resultados sugerem que o prejuízo na integridade da barreira intestinal pode estar associado a redução da expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ no cólon.

A indução da colite por DSS, associada ao consumo de HFD, resultou em aumento significativo da permeabilidade intestinal, como demonstrado através da presença de FITC-DEXTRAN no soro. Além disso, tanto o DSS como a HFD promoveram encurtamento do cólon, mas sem que houvesse alteração da permeabilidade. Contudo, quando analisamos a permeabilidade em função do tamanho médio do cólon, vimos o aumento significativo no grupo HFD + DSS. Outro resultado que suporta essa importante alteração funcional da barreira no grupo HFD + DSS é a maior redução da quantidade das proteínas Claudina-1, Claudina-2, Ocludina e ZO-1, sugerindo maior dano na barreira intestinal. Acreditamos que o processo inflamatório desencadeado pelo DSS, associado a redução da quantidade de receptores $\alpha 7nAChR$ exacerba os danos à estrutura da barreira no cólon. A literatura tem descrito que a HFD por 3 semanas induziu atrofia do intestino delgado e do cólon e reduziu o número de linfócitos intraepiteliais do intestino delgado e linfócitos da lâmina própria. Este efeito continuou por 2 semanas após o retorno a dieta padrão (TANAKA et al., 2020).

Em nosso estudo, ao avaliarmos os cortes histológicos do cólon, observamos que a colite induzida por DSS levou ao agravamento da infiltração de células inflamatórias e de erosões na mucosa em camundongos, independente da dieta ofertada.

Estudo de Kim et al, mostrou que a dieta rica em gordura induziu inflamação do cólon, incluindo o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, a indução do receptor Toll-like 4 (TLR4), iNOS, COX-2 e a ativação de NF- κ B no cólon (KIM et al., 2012). A alimentação com HFD também induziu a gp91, uma subunidade da NADPH oxidase, e promoveu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) tanto nas células epiteliais do cólon, quanto nas células da lâmina própria (LI et al., 2019). A ativação do NF- κ B é importante para a indução da expressão de citocinas inflamatórias e o desenvolvimento da colite, com consequente aumento da permeabilidade, como citado anteriormente. Outro aspecto importante é que a associação da HFD e DSS reduziu a expressão da SIRT1. A ativação de SIRT1 tem sido associada a melhora do quadro inflamatório na colite, justamente pelo seu efeito de inibir a atividade de NF- κ B (ZAGHLOUL; ELSHAL; ABDELMAGEED, 2022) e com isso reduzir o processo inflamatório, sugerindo que a célula possa estar mais permissiva a ativação de vias inflamatórias. A SIRT1 em células musculares lisas

vasculares também é modulada pela ativação do receptor $\alpha 7nAChR$ (LI et al., 2016), sugerindo que a redução da expressão do receptor associado a menor quantidade de SIRT1 também possa contribuir para a menor inibição do NF- κB no tecido destes animais.

Além disso, nossos resultados demonstraram uma diminuição de albumina no soro de animais com colite, que pode não estar sendo suficiente na participação da ligação e da remoção de espécies reativas de oxigênio derivados de neutrófilos, afetando a regulação da sinalização ativada pelo processo inflamatório (KOUOH et al., 1999), corroborando o resultado do aumento da atividade da mieloperoxidase, identificada pelo aumento de neutrófilos.

Finalmente, como já mostrado na literatura, a ativação do receptor $\alpha 7nAChR$ com GTS-21 modula a expressão das proteínas da barreira intestinal (YE et al., 2022). Em nossas análises, animais KO $\alpha 7$ que consumiram dieta hiperlipídica por 4 semanas, mostraram encurtamento do comprimento do cólon e redução da expressão gênica de Claudina4, Claudina1 e Tjp1 no cólon. Entretanto, observamos que esses camundongos com a deleção do receptor $\alpha 7nAChR$ (KO $\alpha 7$), apresentaram maior conteúdo proteico das proteínas ZO-1, Ocludina e Claudina-2 comparado ao grupo WT, ambos consumindo dieta CT.

Com os dados obtidos até o momento, os animais KO $\alpha 7$ aparentemente apresentam uma estrutura compensatória das proteínas de junção, na tentativa de amenizar o possível estado inflamatório da barreira intestinal do animal. Ainda será necessário que o grupo KO $\alpha 7$ seja avaliado com a indução da colite por DSS para que possamos identificar o efeito direto da ausência do receptor $\alpha 7nAChR$ na integridade da barreira intestinal.

Uma hipótese inicial seria a relação do animal KO $\alpha 7$ e aumento dos níveis proteicos de Claudina2 com os níveis de Ca^{2+} . Como já mostrado na literatura, as funções fisiológicas neuronais básicas não podem ser alcançadas sem $\alpha 7nAChR$, que é amplamente expresso em neurônios. Sua ativação leva ao influxo de cálcio que aumenta os níveis de Ca^{2+} nos neurônios, o que contribui para a transmissão sináptica (GRAY et al., 1996; SHOOP et al., 2001; VOGT; REGEHR, 2001). No intestino a absorção de Ca^{2+} ocorre por vias transcelulares ou paracelulares. Vários relatos sugerem que o cólon é essencial para a homeostase do Ca^{2+} (CURRY et al., 2020; JIANG et al., 2020). As Claudinas formadoras de poros ou barreiras são

responsáveis pelo movimento paracelular de solutos, alterando as características de seletividade de carga e tamanho (ALEXANDER; RIEVAJ; DIMKE, 2014). Tanto a claudina-2 quanto a claudina-12 são expressas em todo o epitélio intestinal e contribuem para a permeabilidade ao Ca^{2+} na cultura celular (FUJITA et al., 2008). Portanto nossos resultados podem sugerir que a deleção desse receptor possa estar compensando, através do aumento da Claudina2, a homeostase do Ca^{2+} .

7 CONCLUSÃO

Contudo, nossos resultados indicam que o consumo da HFD altera a expressão de proteínas da barreira e aumenta a permeabilidade intestinal quando associada ao DSS. Concomitantemente também mostramos que o receptor $\alpha 7\text{nAChR}$ tem sua expressão significativamente reduzida pela HFD, estabelecendo uma relação temporal entre os dois eventos. Assim, nos parece que o prejuízo na expressão do receptor pode contribuir para os eventos moleculares associados ao desenvolvimento e agravamento da DII.

Limitações do Estudo

O estudo realizado apresentou limitações importantes quanto à evolução clínica e o processo inflamatório da colite experimental induzida por DSS em animais knockout $\alpha 7$, devido ao curto período para manutenção do acasalamento dessa linhagem. Ademais, encontramos dificuldades na análise de RT-PCR dos grupos tratados com DSS, pela contaminação com DNA genômico e inibição da transcriptase reversa promovida pelo DSS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, R. T.; RIEVAJ, J.; DIMKE, H. Paracellular calcium transport across renal and intestinal epithelia. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 92, n. 6, p. 467–480, dez. 2014.
- AL-SADI, R. et al. Mechanism of IL-1 β -Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 8, p. 5653–5661, 15 abr. 2008.
- ANDERSEN, V. et al. A proposal for a study on treatment selection and lifestyle recommendations in chronic inflammatory diseases: A danish multidisciplinary collaboration on prognostic factors and personalised medicine. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 2017.
- BAIN, C. C. et al. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 3, p. 498–510, maio 2013.
- BAUMGART, D. C. ET AL. Prospective randomized open-label multicenter phase I/II dose escalation trial of visilizumab (HuM291) in severe steroid-refractory ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 16, n. 4, p. 620–629, 2010.
- BILSKI, J. et al. Role of obesity, mesenteric adipose tissue, and adipokines in inflammatory bowel diseases. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, 2019.
- BONAZ, B., SINNIGER, V., HOFFMANN, D., CLARENC, ON, D., MATHIEU, N., DANTZER, C., VERCUEIL, L., PICQ, C., TROCME´, C., FAURE, P., ET AL. Chronic vagus nerve stimulation in Crohn’s disease: a 6-month follow-up pilot study. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 28, p. 948–953, 2016.
- BRADLEY, P. P., CHRISTENSEN, R. D., AND ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618–622, 1982.
- CANCELLO, R. et al. The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ in subcutaneous mature adipocytes : downregulation in human obesity and modulation by diet-induced weight loss. **International Journal of Obesity**, n. December 2011, p. 1552–1557, 2012.
- CANI, P. D. et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**, v. 50, n. 11, p. 2374–2383, 2007.
- CANI, P. D. Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 2018.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 6, p. 729–734, 2007.
- CANI, P. D. ET AL. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. July, p. 1761–1772, 2007.
- CAPALDO, C. T.; NUSRAT, A. Cytokine regulation of tight junctions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 4, p. 864–871, abr. 2009.
- CHELAKKOT, C.; GHIM, J.; RYU, S. H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 8, p. 1–9, 16 ago. 2018.
- COBRIN, G. M.; ABREU, M. T. Defects in mucosal immunity leading to Crohn’s disease. **Immunological Reviews**, v. 206, n. 1, p. 277–295, ago. 2005.
- COCO CHU, D. A. AND I. M. C. Neuro-immune Interactions in the Tissues. **Immunity**, v. 52, n. 3, p. 464–474, 2020.
- COX, A. J.; WEST, N. P.; CRIPPS, A. W. Obesity , infl ammation , and the gut microbiota. v. 3, n. March, 2015.

- CURRY, J. N. et al. Claudin-2 deficiency associates with hypercalciuria in mice and human kidney stone disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 4, p. 1948–1960, 9 mar. 2020.
- DA SILVA, F. A. R., PASCOAL, L. B., DOTTI, I., SETSUKO AYRIZONO, M. L., AGUILAR, D., R.; B. L., ARROYES, M., FERRER-PICON, E., MILANSKI, M., VELLOSO, L. A., FAGUNDES, J. J., SALAS, A., A.; LEAL, R. F. Whole transcriptional analysis identifies markers of B, T and plasma cell signaling pathways in the mesenteric adipose tissue associated with Crohn's disease. **Journal of Translational Medicine**, p. 1–14, 2020.
- DE SILVA, P. S. A. et al. Dietary arachidonic and oleic acid intake in ulcerative colitis etiology: A prospective cohort study using 7-day food diaries. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, n. 1, p. 11–18, 2014.
- DI GIOVANGIULIO, M. et al. Vagotomy affects the development of oral tolerance and increases susceptibility to develop colitis independently of α -7 nicotinic receptor. **Molecular Medicine**, v. 22, n. 8, p. 464–476, 2016.
- DI SABATINO, A. et al. New Pathogenic Paradigms in Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 2, p. 368–371, fev. 2012.
- DIELEMAN, L. A., ET AL. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. **Clin Exp Immunol**, v. 114, p. 385–391, 1998.
- ESHELMAN, M. A. et al. Tristetraprolin targets Nos2 expression in the colonic epithelium. **Scientific Reports**, n. September, p. 1–13, 2019.
- FACHI ET AL. Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile - Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Article Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile -Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. **Cell Reports**, p. 750–761, 2019.
- FELLOWS, R. et al. Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. **Nature Communications**, p. 1–15, 2018.
- FRAZIER, T. H.; DIBASE, J. K.; MCCLAIN, C. J. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 35, n. 5 SUPPL., p. 14–20, 2011.
- FUCILINI, L. M. P. et al. EPIDEMIOLOGICAL PROFILE AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES IN A BRAZILIAN REFERRAL CENTER. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 58, n. 4, p. 483–490, out. 2021.
- FUJITA, H. et al. Tight Junction Proteins Claudin-2 and -12 Are Critical for Vitamin D-dependent Ca^{2+} Absorption between Enterocytes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 5, p. 1912–1921, maio 2008.
- GASPARINI, R. G.; SASSAKI, L. Y.; SAAD-HOSSNE, R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 11, p. 423–429, 2018.
- GENSER L., AGUANNO D., SOULA H.A., DONG L., TRYSTRAM L., ASSMANN K., SALEM J.E., VAILLANT J.C., OPPERT J.M., LAUGERETTE F., ET AL. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. **J. Pathol.**, v. 246, p. 217–230, 2018.
- GHIA, J. E. et al. The Vagus Nerve: A Tonic Inhibitory Influence Associated With Inflammatory Bowel Disease in a Murine Model. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1122–1130, 2006.
- GHIA, J. E., BLENNERHASSETT, P., AND COLLINS, S. M. Impaired parasympathetic function increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. **J Clin Invest**, v. 118, p. 2209–2218, 2008.

- GHIA, J. E., GALEAZZI, F., FORD, D. C., HOGABOAM, C. M., VALLANCE, B. A., AND COLLINS, S. Role of M-CSF-dependent macrophages in colitis is driven by the nature of the inflammatory stimulus. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 294, p. G770-777, 2008.
- GHOSH, S. et al. Diets rich in n-6 PUFA induce intestinal microbial dysbiosis in aged mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 3, p. 515–523, 2013.
- GRAY, R. et al. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. **Nature**, v. 383, n. 6602, p. 713–716, out. 1996.
- GRUBER, L. et al. High Fat Diet Accelerates Pathogenesis of Murine Crohn's Disease-Like Ileitis Independently of Obesity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–13, 2013.
- GUERVILLE, M.; BOUDRY, G. Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. 2016.
- GÜNZEL, D.; YU, A. S. L. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 2, p. 525–569, abr. 2013.
- GUO, M. et al. Role of Non-Muscle Myosin Light Chain Kinase in Neutrophil-Mediated Intestinal Barrier Dysfunction During Thermal Injury. **Shock**, v. 38, n. 4, p. 436–443, out. 2012.
- HANAUER, S. B.; MEYERS, S. Management of Crohn's disease in adults. **American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 4, p. 635–643, 2001.
- HANSBERRY, D. R. et al. Fecal Myeloperoxidase as a Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. **Cureus**, 31 jan. 2017.
- HIEMSTRA, I. H. et al. The identification and developmental requirements of colonic CD169⁺ macrophages. **Immunology**, v. 142, n. 2, p. 269–278, jun. 2014.
- HOU, J. K., ABRAHAM, B., AND EL-SERAG, H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. **Am J Gastroenterol**, v. 106, p. 563–573, 2011.
- HUA, S., EK, C.J., MALLARD, C., JOHANSSON, M. E. Perinatal hypoxia-ischemia reduces $\alpha 7$ nicotinic receptor expression and selective $\alpha 7$ nicotinic receptor stimulation suppresses inflammation and promotes microglial Mox phenotype. **BioMed Res. Int.**, 2014.
- JIANG, H. et al. Targeting 1,25(OH)₂D-mediated calcium absorption machinery in proximal colon with calcitriol glycosides and glucuronides. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 198, p. 105574, abr. 2020.
- JONGE, W. J. DE et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. v. 6, n. 8, p. 844–852, 2005.
- KIM, K. et al. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- KOTZE, P. G. et al. Progression of Inflammatory Bowel Diseases Throughout Latin America and the Caribbean: A Systematic Review. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 2, p. 304–312, 2020.
- KOUOH, F. et al. Antioxidant properties of albumin : Effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes Antioxidant properties of albumin : effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. n. November, 1999.
- KURASHIMA, Y.; GOTO, Y.; KIYONO, H. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 12, p. 3108–3115, 2013.
- LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A. Anti-inflammatory effects of nicotine in obesity and ulcerative colitis. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 129, 2011.
- LEE, J. et al. Obesogenic diet-induced gut barrier dysfunction and pathobiont expansion aggravate experimental colitis. **PLoS ONE**, p. 1–27, 2017.

- LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2005.
- LEY, R. E., TURNBAUGH, P. J., KLEIN, S., AND GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022–1023, 2006.
- LI, D.-J. et al. $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Relieves Angiotensin II–Induced Senescence in Vascular Smooth Muscle Cells by Raising Nicotinamide Adenine Dinucleotide–Dependent SIRT1 Activity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 8, p. 1566–1576, ago. 2016.
- LI, N. et al. Berberine attenuates pro-inflammatory cytokine-induced tight junction disruption in an in vitro model of intestinal epithelial cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 1, p. 1–8, abr. 2010.
- LI, X. et al. High-fat diet promotes experimental colitis by inducing oxidative stress in the colon. **Am J Physiol Gastrointest Fígado Physiol**, p. 453–462, 2019.
- LICHTENSTEIN, G. R. et al. ACG Clinical Guideline: Management of Crohn’s Disease in Adults. **American Journal of Gastroenterology**, v. 113, n. 4, p. 481–517, 2018.
- LU, Z. et al. Distribution and functional significance in health and diseases Claudins in intestines. n. September, p. 1–14, 2013.
- LYKHMUS, O., GERGALOVA, G., ZOURIDAKIS, M., TZARTOS, S., KOMISARENKO, S., SKOK, M. Inflammation decreases the level of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the brain mitochondria and makes them more susceptible to apoptosis induction. **Int. Immunopharm.**, v. 29, p. 148–151, 2015.
- MARCHIANDO, A. M. et al. Caveolin-1–dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 1, p. 111–126, 5 abr. 2010.
- MARONEK, M. et al. Extracellular DNA Correlates with Intestinal Inflammation in Chemically Induced Colitis in Mice. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 81, 6 jan. 2021.
- MARTINS, I. C. A. et al. Omega-3 Supplementation Prevents Short-Term High-Fat Diet Effects on the $\alpha 7$ Nicotinic Cholinergic Receptor Expression and Inflammatory Response. v. 2021, 2021.
- MATSUMURA, A., SUZUKI, S., IWAHARA, N., HISAHARA, S., KAWAMATA, J., SUZUKI, H., YAMAUCHI, A., TAKATA, K., KITAMURA, Y., SHIMOHAMA, S. Temporal changes of CD68 and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor expression in microglia in Alzheimer’s disease-like mouse models. **J. Alzheimers Dis.**, v. 44, p. 409–423, 2015.
- MATTEOLI, G. et al. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. **Gut**, v. 63, n. 6, p. 938–948, 2014.
- ORDÁS, I. et al. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1606–1619, 2012.
- PAIK, J., FIERCE, Y., TREUTING, P. M., BRABB, T., AND MAGGIO-PRICE, L. High-fat diet-induced obesity exacerbates inflammatory bowel disease in genetically susceptible *Mdr1a*^{-/-} male mice. **J Nutr**, v. 143, n. 2, p. 1240–1247, 2013.
- PLATT, A. M. et al. An Independent Subset of TLR Expressing CCR2-Dependent Macrophages Promotes Colonic Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 6843–6854, 15 jun. 2010.
- PUSCEDDU, M. M. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) reverse the impact of early-life stress on the gut microbiota. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–13, 2015.
- QI, Y. et al. High - fat diet - induced obesity affects $\alpha 7$ nicotine acetylcholine receptor expressions in mouse lung myeloid cells. **Scientific Reports**, p. 1–13, 2020.
- QIAN C, C. X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1283, p. 67–74, 2013.

- RANAIVO, H. R. et al. Protection Against Endotoxic Shock as a Consequence of Reduced Nitrosative Stress in MLCK210-Null Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 2, p. 439–446, fev. 2007.
- RESCIGNO, M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 6, p. 256–264, jun. 2011.
- ROSAS-BALLINA, M. et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 31, p. 11008–11013, 2008.
- ROSAS-BALLINA, M., OLOFSSON, P.S., OCHANI, M., VALDE´ S-FERRER, S.I., LEVINE, Y.A., REARDON, C., TUSCHE, M.W., PAVLOV, V.A., ANDERSSON, U., CHAVAN, S., ET AL. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 98–101, 2011.
- RUGTVEIT, J. et al. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 112, n. 5, p. 1493–1505, maio 1997.
- SCHWANKE, R. C. et al. EPA- and DHA-derived resolvins' actions in inflammatory bowel disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 785, p. 156–164, 2016.
- SEHGAL, A. et al. The role of CSF1R-dependent macrophages in control of the intestinal stem-cell niche. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1272, 28 mar. 2018.
- SHAMOON, M.; MARTIN, N. M.; O'BRIEN, C. L. Recent advances in gut Microbiota mediated therapeutic targets in inflammatory bowel diseases: Emerging modalities for future pharmacological implications. **Pharmacol Res**, v. 148, n. 104344, 2019.
- SHAO, B. et al. Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Alleviates Inflammatory Bowel Disease Through Induction of AMPK-mTOR-p70S6K-Mediated Autophagy. v. 42, n. 5, p. 1666–1679, 2019.
- SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. v. 116, n. 11, p. 3015–3025, 2006.
- SHOOP, R. D. et al. Synaptically Driven Calcium Transients via Nicotinic Receptors on Somatic Spines. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 771–781, 1 fev. 2001.
- SILICIANO, J. D.; MOOSEKER, M. S. Identification of ZO-1 : A High Molecular Weight Polypeptide Associated with the Tight Junction (Zonula Occludens) in a Variety of Epithelia. v. 103, n. September, p. 35–37, 1986.
- SOUZA, A. C. P. et al. Short-Term High-Fat Diet Consumption Reduces Hypothalamic Expression of the Nicotinic Acetylcholine Receptor α 7 Subunit (α 7nAChR) and Affects the Anti-inflammatory Response in a Mouse Model of Sepsis. v. 10, n. March, p. 1–15, 2019.
- SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 4, p. 631–659, 11 fev. 2013.
- SZILAGYI, A. Relationship(s) between obesity and inflammatory bowel diseases: possible intertwined pathogenic mechanisms. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 2, p. 139–152, 2020.
- TANAKA, S. et al. High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 522, n. 4, p. 971–977, 2020.
- TARGAN, S. R.; KARP, L. C. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. **Immunological Reviews**, v. 206, n. 1, p. 296–305, ago. 2005.
- THIESEN, S. et al. CD14hiHLA-DRdim macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 3, p. 531–541, 8 nov. 2013.

- TIAN, Z. et al. Dietary inflammation potential mediated gut microbiota and metabolite alterations in Crohn's disease: A fire-new perspective. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 1260–1271, 2022.
- TRIANTAFILLIDIS, J. K.; MERIKAS, E.; GEORGOPOULOS, F. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, p. 185–210, 2011.
- VOGT, K. E.; REGEHR, W. G. Cholinergic Modulation of Excitatory Synaptic Transmission in the CA3 Area of the Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 75–83, 1 jan. 2001.
- WALLACE, K. L. et al. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 6–21, 2014.
- WANG, F. et al. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Synergize to Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Up-Regulating Myosin Light Chain Kinase Expression. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 2, p. 409–419, fev. 2005.
- WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384–388, 2003.
- WAY, S. et al. $\alpha 7$ Nicotinic Agonist AR-R17779 Protects Mice against Acid-Induced Colitis in a Spleen-Dependent Way. **Front Pharmacol**, v. 8, n. November, p. 1–14, 2017.
- YE, D.; MA, I.; MA, T. Y. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 3, p. G496–G504, mar. 2006.
- YE, Z. et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS - 21 attenuates DSS - induced intestinal colitis by improving intestinal mucosal barrier function. **Molecular Medicine**, 2022.
- ZAGHLOUL, M. S.; ELSHAL, M.; ABDELMAGEED, M. E. Preventive empagliflozin activity on acute acetic acid-induced ulcerative colitis in rats via modulation of SIRT-1 / PI3K / AKT pathway and improving colon barrier. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 91, n. February, p. 103833, 2022.