

**Iuri Reino Mariano**

**Projeto de Iniciação Científica**

*Efeito do tratamento com LPS na expressão e sinalização de proteínas de oclusão em camundongos C57BL/6 e células Caco-2*

**Orientadora:** Dra. Andrea Moro Caricilli

**São Paulo**

**2013**

## **Introdução**

A obesidade, caracterizada por um amplo desbalanço energético, é o resultado de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais, como os hábitos alimentares, a alta ingestão de alimentos e o sedentarismo (1). Em 2008 a obesidade foi estimada em 11% da população mundial, entre homens e mulheres de 20 anos ou mais, sendo que 35% que estão acima do peso ideal (2). No Brasil, em 2010, entre 15 e 80 anos, 54% dos homens e 60,3% das mulheres estão acima do peso ideal, ou seja possuem índice de massa corporal (IMC) acima de 25kg/m<sup>2</sup>. Dentro desta prevalência, 12,4% dos homens e 24,5% das mulheres possuem IMC acima de 30kg/m<sup>2</sup> e são considerados obesos (3).

A obesidade, por promover um conjunto de alterações metabólicas, revela uma maior propensão para o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 (1). Inicialmente observa-se o desencadeamento da resistência à insulina, associada à inflamação subclínica (4, 5), que se observa por aumento de produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no tecido adiposo (6, 7). No entanto pouco se sabe sobre os mecanismos que levam a tal aumento.

Em indivíduos saudáveis, a insulina, quando ligada ao seu receptor, leva à sua autofosforilação em vários resíduos de tirosina, dada sua atividade tirosina-quinase intrínseca, levando também à fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) (9), culminando na ativação de fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K), proteína quinase B (AKT) e translocação de vesículas GLUT para a membrana plasmática da célula (8, 9). Em quadros de resistência à insulina é observado que a fosforilação ocorre em serina do IRS-1 e IRS-2, reduzindo assim a sensibilidade à insulina (9).

A fosforilação inibitória de resíduos de serina de IRS-1 e IRS-2 pode ser estimulada pela ativação das vias da quinase c-Jun N-terminal (JNK) e da quinase inibitória de kB (IKK) (10, 11), prejudicando a sinalização da insulina (4). Estas vias são integradas na resistência à insulina através de receptores de membrana, como os *Toll-like receptors* (TLRs) (15), que podem ser ativados tanto por ácidos graxos saturados, como por componentes da microbiota intestinal (15). Quando as vias JNK e IKK são ativadas, elas estimulam a produção e secreção dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , este último revela-se um grande estimulador da fosforilação por serina de IRS-1 e IRS-2(1).

Ademais, o aumento da resposta inflamatória pode estar associada ao aumento sérico de endotoxinas como o LPS, lipopolissacarídeo oriundo de paredes de bactérias gram-negativas (1). O LPS é importante ligante do TLR4 e associado a um aumento da ativação de vias pró-inflamatórias (16). Estudos recentes mostram que indivíduos obesos têm aumento da ativação de vias inflamatórias associada ao aumento da concentração de LPS no sangue, evento este chamado de endotoxemia metabólica (11, 13).

A maneira pela qual ocorre um aumento na concentração sérica de LPS tem sido descrito como decorrente do aumento de sua absorção intestinal, a qual se verifica por redução da expressão de proteínas de oclusão, como zônula occludens (ZO-1) e ocludina (13).

Quando aderidas, as células intestinais estabelecem união através de um emparelhamento de proteínas transmembranais, claudinas e ocludinas, com proteínas citoplasmáticas adaptadas com a ZO-1, resultado de uma cascata de fosforilações e ligações com filamentos de actina, havendo uma conformação citoesquelética (14), formando um complexo com junções aderentes e desmossomos para selar a passagem de substâncias, as junções de oclusão (14), evento crucial para evitar a absorção do LPS e translocação bacteriana.

No entanto, ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual ocorre alteração na permeabilidade intestinal no contexto da obesidade e da resistência à insulina. O fato de ocorrer alteração nas proporções de filos bacterianos quando da obesidade (12) é indício de que componentes bacterianos possam exercer modulação para a expressão dessas proteínas de oclusão e, por conseguinte, para a permeabilidade intestinal.

Assim, o presente trabalho propõe-se a estudar se o LPS, proveniente da microbiota intestinal, seria capaz de alterar a expressão de proteínas de junção celular.

## **Objetivo**

- Compreender se o LPS, proveniente da microbiota intestinal, é capaz de, por si só, sinalizar para alteração da expressão de proteínas de oclusão;
- Investigar se o estímulo com LPS é capaz de alterar a permeabilidade intestinal; e
- Estudar a via pela qual o LPS possivelmente interfere com essas proteínas de oclusão dos enterócitos, pela porção apical ou basolateral.

## **Material e Métodos**

### *Material*

- Modelo animal: Camundongos C57BL/6. Obtidos do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo). Os animais serão criados e mantidos sob condição livre de patógenos específicos no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- Cultura celular: Células Caco-2 cultivadas em meio de cultura de uma placa com 6 poços em 2,5mL de DMEM/F-12, com soro fetal bovino a 10% . E células Caco-2 ( $1 \times 10^5$ ) semeadas em uma membrana de poliéster de 0,4 $\mu\text{m}$  de um suplemento “transwell” (Corning, México), em 1,5mL do mesmo meio de cultura.

### *Métodos*

- Estudo da permeabilidade intestinal:

Fluoresceína de dextran: Os camundongos, após 6h de jejum, receberão fluoresceína isotiocianato (FITC)-dextran por gavagem (600 mg/kg peso corporal, 125 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Após 1h, será coletado sangue da ponta da veia da cauda), como anteriormente descrito (12). Células cultivadas em inserts Transwell® (Corning, México) também serão submetidas a este teste, recebendo 0,2mg/mL de fluoresceína de dextran na porção apical e, após 1h, o meio de cultura de fora do inserto será coletado para dosagem.

Western Blotting: fragmentos do intestino delgado e grosso serão extraídos e as proteínas de junção celular, como ZO-1, ocludina, claudina 1 e 2, bem como as proteínas de sinalização que culminam em sua expressão, serão avaliadas por Western Blotting), como anteriormente descrito (13).

- Medida de resistência elétrica transepitelial: Células cultivadas em inserts terão sua resistência elétrica transepitelial mensurada por um voltímetro EVOM (World Precision Instruments, Sarasota, Flórida), como anteriormente descrito (17).

## **Plano de Trabalho**

Maio-Julho/2013: Aprendizado de técnicas de cultura celular e manipulação de camundongos. Estudo dose-resposta de LPS *in vitro*.

Julho-Setembro/2013: Coleta de amostras de Caco-2 para estudo de sinalização de proteínas de oclusão por Western Blot; Avaliação de resistência elétrica transepitelial de Caco-1 após estímulo com LPS na dose estabelecida entre maio e setembro. Teste de permeabilidade Dextran-FITC.

Outubro-Novembro/2013: Estudo dose-resposta de LPS *in vivo*. Coleta de amostras para estudo de sinalização de proteínas de oclusão em intestino delgado e grosso de camundongos tratados com LPS (Western Blot).

Janeiro-Fevereiro/2013: Avaliação de resistência elétrica transepitelial de explantes de intestino delgado e grosso após estímulo com LPS na dose estabelecida entre maio e setembro. Teste de permeabilidade Dextran-FITC após estímulo com LPS.

Março-Abril/2013: Análise dos resultados obtidos e elaboração de relatório e artigo científico.

## **Características do aluno**

Este projeto será desenvolvido no Laboratório de Imunobiologia de Transplantes, do Prof. Dr Niels Olsen Saraiva Câmara, no Departamento de Imunologia do ICB IV, da USP. Hoje, o Laboratório conta com uma infra-estrutura de pesquisadores e de equipamentos que autoriza a realização deste projeto sem dificuldades. A experiência científica do grupo pode ser comprovada nas publicações em revistas de

impacto, nas teses defendidas e nos projetos de pesquisa de agências de fomento conseguidos, que culminaram com várias publicações na área de Imunologia de Transplantes. A orientadora possui em sua bagagem científica experiência sólida com metabologia obtida em laboratório de referência internacionalmente reconhecida, o Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina, sob orientação do Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad. Sua pesquisa sobre a interface entre metabolismo e resposta imunológica à microbiota intestinal mostrou-se proeminente com a publicação do trabalho “Gut microbiota is a key modulator in insulin resistance of TLR2 knockout mice”, publicado na PLoS Biology (2011). Simultaneamente, Andrea Caricilli desenvolveu pesquisas envolvendo metabolismo e alterações provenientes do sistema nervoso central, envelhecimento e cicatrização, resultando em mais nove publicações em revistas de alto impacto, como Diabetes e Endocrinology.

O aluno, graduando no curso de Biomedicina nas Faculdades Metropolitanas Unidas, possui ótimo desempenho na universidade e muito interesse pelo desenvolvimento científico, tendo participado de simpósios e congressos, como o XIII Congresso Brasileiro de Biomedicina 2012. Há três meses, tem estagiado no laboratório e acompanhado diversos experimentos de Andrea Caricilli, com grande assiduidade. Ademais, o aluno teve destaque no concurso de imagens Life Sciences 2012, pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, no qual recebeu Menção Honrosa pela avaliação por banca e 1º lugar na votação online por sua fotografia.

## Referências

1. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, et al.: Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772, 2007
- 2 (WHO) Organização Mundial da Saúde; <http://www.who.int>
- 3 (WHO) Organização Mundial da Saúde <http://migre.me/dWxYC>
4. Wollen KE, Hotamisligil GS: Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119, 2005
5. Olefsky JM, Glass CK: Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 72: 219-246, 2010
6. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, et al.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808, 2003
7. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91, 1993
8. Saltiel AR, Kahn CR: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806, 2001
9. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR: Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103:931–943, 1999
10. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB: The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396: 77-80, 1998
11. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409-2415, 1995
12. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, et al.: Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481, 2008.
13. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, et al.: Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *BMJ Journals* 58: 1091-1103, 2009
14. Shen L: Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1258: 9-18, 2012
15. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ: Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1986-1998, 2007
16. Bromfield JJ, Sheldon IM: Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo..., 2013
17. Buzzia MS, Netzel-Arnett S, Shea-Donohue T, Zhao A, Lin CY, et al.: Membrane-anchored serine protease matriptase regulates epithelial barrier formation and permeability in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 4200-4205, 2010