



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



Ísis de CÁSSIA ALVES MARTINS

**PREVENÇÃO DE DANOS INFLAMATÓRIOS NO
HIPOTÁLAMO PELA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO
GRAXO ω 3 EM MODELO DE SEPSE: O PAPEL DO
RECEPTOR COLINÉRGICO**

LIMEIRA

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



ÍISIS DE CÁSSIA ALVES MARTINS

**PREVENÇÃO DE DANOS INFLAMATÓRIOS NO
HIPOTÁLAMO PELA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO
GRAXO ω 3 EM MODELO DE SEPSE: O PAPEL DO
RECEPTOR COLINÉRGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Nutrição à Faculdade de Ciências
Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni

LIMEIRA
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

M366p Martins, Ísis de Cássia Alves, 1996-
Prevenção de danos inflamatórios no hipotálamo pela suplementação com ácido graxo w3 em modelo de sepse o papel do receptor colinérgico / Ísis de Cássia Alves Martins. – Limeira, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Marcio Alberto Torsoni.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Sepse. 2. Hipotálamo. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7. 5. Ácidos graxos ômega-3. I. Torsoni, Marcio Alberto, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Prevention of inflammatory damage in hypothalamus by supplementation with w3 fatty acids in a sepsis model the role of cholinergic receptor

Palavras-chave em inglês:

Sepsis

Hypothalamus

High fat diet

Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7

Omega-3 fatty acids

Titulação: Bacharel em Nutrição

Banca examinadora:

Marcio Alberto Torsoni [Orientador]

Maíra Schuchter Ferreira

Data de entrega do trabalho definitivo: 20-07-2020

Autor: Ísis de Cássia Alves Martins

Título: Prevenção de danos inflamatórios no hipotálamo pela suplementação com ácido graxo w3 em modelo de sepse: o papel do receptor colinérgico

Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Nutrição

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 20/07/2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)



Mestra Maíra Schuchter Ferreira – Avaliador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da monografia aprovada.



Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni (Orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar durante todo o período da graduação e me iluminar na tomada das decisões que me fizeram chegar até aqui e a Santa Rita de Cássia por todas as bençãos a mim concedidas.

Agradeço à minha família por todo apoio. Minha mãe Rita, por nunca negligenciar qualquer tipo de ajuda que necessitei e pela preocupação desde o primeiro ano em que fui morar em Limeira, meu pai Helio por todo incentivo de sucesso de sempre, e ao meu irmão Igor, por ser meu exemplo desde sempre e por me incentivar e auxiliar em tudo.

Não poderia deixar de agradecer também a família que ganhei durante os anos em Limeira, minhas amigas Letícia Contieri, Giovanna Alexandre, Bárbara Costa e Beatriz Spagnol. Sou muito grata por ter conhecido vocês no primeiro dia de matrícula e por continuarmos sempre juntas, seja durante as aulas, trabalhos, festas, ou pelo simples fato de ficarmos em casa juntas. Seja qual fosse a dificuldade que surgisse, saber que estávamos juntas tornava tudo mais fácil.

A todos os colegas e professores do LabDiMe, local onde desenvolvi esse projeto de pesquisa e colaborei em outros. Em especial a amigas que nunca imaginei ficar tão próxima: Camila Libardi, Alana Veras e Camilla Mendes, obrigada por todos os ensinamentos que vocês me deram e ainda dão, por todo apoio durante minhas duas Iniciações Científicas, por todos os conselhos e cafés. Sem dúvida vocês foram fundamentais para o meu crescimento e amadurecimento pessoal e profissional. A minha amiga Letícia, especialmente, pela parceria e companhia desde o primeiro dia que fomos ao Laboratório até o fim do nosso projeto. Tenho certeza de que fomos melhores juntas e assim continuaremos.

Por fim agradeço a todos os professores pela forma como transmitiram o seu conhecimento, que impactará de forma direta no tipo de profissional que serei. Em especial ao meu orientador Márcio Torsoni, por ter sido o incentivo principal, desde as primeiras aulas de Bioquímica, para que eu entrasse no laboratório e adquirisse admiração pelo ambiente acadêmico. Obrigada por toda orientação, paciência e auxílio durante os anos de laboratório.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

(José de Alencar)

MARTINS. Ísis de Cássia Alves. Prevenção de danos inflamatórios no hipotálamo pela suplementação com ácido graxo ω 3 em modelo de sepse: o papel do receptor colinérgico. 2020. nº 45. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Nutrição. – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2020.

RESUMO

A via anti-inflamatória colinérgica promove a liberação de acetilcolina pelo terminal nervoso que ativa receptores colinérgicos do tipo nicotínico (α 7nAChR) em células alvo. A ativação destes receptores reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias em diferentes tipos celulares e aumenta a sobrevivência em modelo de sepse. Dados do nosso grupo mostraram que animais que consumiram dieta rica em gorduras saturadas por curto período apresentam prejuízo da resposta anti-inflamatória colinérgica com redução da expressão do receptor α 7nAChR no hipotálamo e aumento da mortalidade em dois modelos de sepse. A sepse é uma síndrome clínica induzida por infecção e caracterizada por uma reação inflamatória incontrolada que pode ser induzida experimentalmente através da cirurgia de ligadura e punção cecal (CLP). A atividade do receptor GPR120, ativado por ácidos graxos de cadeia longa, tem sido estudada como um outro mecanismo anti-inflamatório, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Nossa hipótese de estudo foi que a suplementação prévia com o ácido graxo ω 3 possa prevenir os danos causados pela dieta hiperlipídica no hipotálamo de camundongos. Camundongos foram suplementados previamente com o ácido graxo ω 3 por 15 dias e submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) no 15º, 16º e 17º dia. Em seguida, a nível basal e após desafio da CLP, o hipotálamo foi coletado e foi avaliado a expressão do α 7nAChR, a ativação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e da ativação de macrófagos via Western blotting, Real-Time PCR e Imunofluorescência. A nível basal, a suplementação prévia não foi capaz de aumentar a expressão do receptor α 7nAChR e reverter os danos causados pela HFD. Após o desafio da CLP, animais que consumiram HFD em conjunto com a suplementação apresentaram aumento da sobrevivência comparado aos que só consumiram HFD, enquanto o grupo HFD morreram mais rápido do que os controles. Paralelamente, testamos o dobro da dose de suplementação a nível basal, onde houve uma tendência de aumento da expressão proteica do receptor α 7nAChR. Após CLP, a nova dose de suplementação foi capaz de aumentar o conteúdo proteico comparado aos grupos controle, mas não comparado ao grupo HFD. A suplementação prévia com ácido graxo ω 3 foi capaz de reverter os danos causados pela HFD em modelo de sepse pelo aumento da expressão do receptor α 7nAChR e aumento da sobrevivência.

Palavras-chave: Sepse, hipotálamo, dieta hiperlipídica, receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7, ácidos graxos ω 3.

MARTINS. Ísis de Cássia Alves. Prevention of inflammatory damage in hypothalamus by supplementation with ω 3 fatty acids in a sepsis model: the role of the cholinergic receptor. 2020. nº 45. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Nutrição. – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2020.

ABSTRACT

A cholinergic anti-inflammatory pathway promotes the release of acetylcholine by the nerve terminal that activates nicotinic-type cholinergic receptors (α 7nAChR) in target cells. Activation of these receptors reduces the production of pro-inflammatory cytokines in different cell types and increases survival in the sepsis model. Data from our study group showing that animals that consumed a short term of diet rich in saturated fats impaired the cholinergic anti-inflammatory response with the reduced expression of the α 7nAChR receptor in the hypothalamus and increased mortality in two models of sepsis. Sepsis is a clinical syndrome induced by infection and characterized by an uncontrolled inflammatory reaction that can be experimentally induced through ligation and cecal puncture surgery (CLP). The activity of the GPR120 receptor, activated by long-chain fatty acids, has been studied as another anti-inflammatory mechanism, using the release of pro-inflammatory cytokines. Our study hypothesis was that previous supplementation with fatty acid ω 3 may reverse the damage caused by the hyperlipidic diet in the hypothalamus of mice. Mice were previously supplemented with omega 3 fatty acid for 15 days and submitted to a high fat diet (HFD) on the 15th, 16th and 17th days. Then, at baseline and after challenge of the CLP, the hypothalamus was collected and the expression of α 7nAChR, activation of pro-inflammatory cytokines and chemokines and activation of macrophages via Western blotting, Real-Time PCR and Immunofluorescence were evaluated. At baseline, previous supplementation was not able to increase the expression of the α 7nAChR receptor and reverse the damage caused by HFD. After the CLP challenge, animals that consumed HFD in conjunction with supplementation showed increased survival compared to those that only consumed HFD, while the HFD group died faster than controls. At the same time, we tested twice the supplementation dose at baseline, where there was a tendency to increase the protein expression of the α 7nAChR receptor. After CLP, the new supplementation dose was able to increase the protein content compared to the control groups, but not compared to the HFD group. Previous supplementation with omega 3 fatty acid was able to reverse the damage caused by HFD in a sepsis model by increasing the content of the α 7nAChR and reduce the risk of sepsis-associated mortality.

Keywords: Sepsis, hypothalamus, high fat diet, nicotinic acetylcholine receptor alpha 7, omega-3 fatty acids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Anatomia funcional do reflexo inflamatório.....	20
Figura 2 - Esquema 1 com a divisão dos grupos experimentais	23
Figura 3 - Esquema 2 com a divisão dos grupos experimentais.	24
Figura 4 - Avaliação do conteúdo proteico de marcadores inflamatórios no hipotálamo.....	29
Figura 5 - Avaliação por RT-qPCR do conteúdo de RNAm de citocinas e quimiocinas no hipotálamo.....	31
Figura 6 - Imunofluorescência de confocal em secções coronais do cérebro.	32
Figura 7 - Taxa de sobrevivência.	33
Figura 8 - Avaliação do conteúdo proteico do receptor $\alpha 7$ nAChR no hipotálamo. ...	34
Figura 9 - Avaliação do conteúdo proteico e do conteúdo de RNAm do receptor $\alpha 7$ nAChR no hipotálamo.	35
Figura 10 - Avaliação do conteúdo proteico de marcadores inflamatórios no hipotálamo.....	37
Figura 11 - Avaliação por RT-qPCR do conteúdo de RNAm de citocinas no hipotálamo.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional da dieta hiperlipídica e da dieta comercial (padrão) que foram empregadas nos protocolos experimentais.	24
Tabela 2 - Número de animais vivos por hora em cada grupo após desafio com CLP	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CCL2	Proteína quimiotóxica de monócitos
cFOS	Protooncogenese que codifica a proteína FOS
<i>Chrna7</i>	Codificação da subunidade alfa 7 do receptor nicotínico de acetilcolina
CLP	Cirurgia de Ligação e Punção Cecal
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
CXCL2	Ligante 2 de quimiocina CXC
CX3CL1	Ligante 1 de quimiocina CX3
DHA	Ácido docosa-hexaenóico
EPA	Ácido Eicosapentanoico
GPR120	Receptor de membrana acoplado a Proteína G 120
HFD	<i>High Fat Diet</i> (Dieta Rica em Gordura)
HFD-CLP	Grupo que recebeu HFD + CLP
HFDω3	<i>High Fat Diet</i> (Dieta Rica em Gordura) + suplementação com ácido graxo ω 3
HFDω3-CLP	Grupo que recebeu HFD + suplementação com ácido graxo ω 3 + CLP
IκB	Inibidor da NF- κ B
IKK	I κ B quinase
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
JAK2	Janus kinase 2

JNK	Quinase c-Jun n-terminal
LPS	Lipopolissacarídeo
mRNA	RNA Mensageiro
nAChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina
NF-κB	fator nuclear kappa B
pNF-κB	fator nuclear kappa B fosforilado
pIKK	IκB quinase fosforilada
pJNK	Quinase c-Jun n-terminal fosforilada
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SC	Controle
SC-SHAM	Grupo que recebeu dieta controle + laparotomia
SC-CLP	Grupo que recebeu dieta controle + CLP
SNC	Sistema Nervoso Central
STAT3	Proteína Transdutora de Sinais e Ativadora de Transcrição 3
TLRs	Receptores <i>toll-like</i>
TLR2	Receptor <i>toll-like 2</i>
TLR4	Receptor <i>toll-like 4</i>
TNF-R	Receptor para fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
α7nAChR	Subunidade alfa 7 do receptor nicotínico de acetilcolina

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
κ	Kapa
β	Beta
ω	Ômega

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 Reflexo Anti-inflamatório	18
3.2 Dieta Hiperlipídica e Inflamação	21
3.3 Ômega 3 e o Efeito Anti-inflamatório	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Animais e desenho experimental	23
4.1.1 Dieta	24
4.1.2 Suplementação	24
4.1.3 Anestesia	25
4.2 Cirurgia de Ligadura e Punção Cecal – CLP.....	25
4.3 Western Blotting	25
4.4 Real Time PCR.....	26
4.5 Imunofluorescência	27
4.6 Análises Estatísticas	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Avaliação de parâmetros inflamatórios mediante exposição à dieta hiperlipídica e suplementação w3.	28
5.2 Efeitos da suplementação com w3 em parâmetros inflamatórios de camundongos expostos a sepse.....	33
6. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXO A – CERTIFICADO CEUA	44

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um fator de risco importante no desenvolvimento das doenças crônicas não transmissíveis, e sabe-se que as intervenções comportamentais ou as mudanças no estilo de vida direcionadas à correção da sobrecarga nutricional e ao aumento da atividade física ainda não são suficientes para diminuir ou interromper o aumento da prevalência da obesidade (ROSS & ALISON, 2009).

Segundo Lumeng e Saltiel (2011), a resposta inflamatória desencadeada pela obesidade envolve o aumento sistêmico de citocinas inflamatórias, sendo essa uma resposta coordenada aos estímulos prejudiciais. Quando as vias pró-inflamatórias são ativadas, as fosforilações/ativações dos componentes da via de sinalização da insulina são prejudicadas, levando à resistência a insulina (PRADA et al., 2005). Ou seja, a ativação da quinase terminal Jun N (JNK) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B) promove a fosforilação de serina substrato do receptor de insulina (IR) na cascata de sinalização (OLEFSKY & GLASS, 2010). A estimulação dessas vias pode ocorrer pela ligação de um ligante no receptor de superfície celular, como os receptores para TNF (TNF-R) e os do tipo Toll-like, como o tipo 4 (TLR-4). Este, por sua vez, pode ser ativado tanto por lipopolissacarídeos (LPS) quanto por ácidos graxos saturados (BASTOS, ROGERO & AREAS, 2009).

Ácidos graxos saturados provenientes da dieta ou originados da lipólise têm sido associados ao aumento da produção de citocinas inflamatórias em diferentes tipos celulares (THALER et al., 2012). Além disso, estudos têm mostrado que o consumo de dieta rica em ácidos graxos saturados, em curtíssimo período, ativa vias inflamatórias no hipotálamo levando a danos importantes para a sinalização hormonal (DE SOUZA et al., 2005; WAISE et al., 2015). Assim, os processos inflamatórios têm papel fundamental no desenvolvimento dos distúrbios metabólicos que estão associados a atividade hipotalâmica.

Embora o processo inflamatório faça parte do sistema imune inato, a potência inflamatória deve ser controlada para evitar danos celulares. O controle da produção de citocinas pode ser realizado por um sistema chamado reflexo anti-inflamatório colinérgico. A via anti-inflamatória colinérgica é ativada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias que culminam na liberação de acetilcolina e na ativação do receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) (TRACEY, 2009). Os receptores

nicotínicos de acetilcolina, são canais iônicos seletivos de cálcio, formados por 5 subunidades, e são amplamente expressos no sistema nervoso central. Os nAChRs apresentam permeabilidade variável de acordo com a sua composição, sendo que os constituídos pela subunidade $\alpha 7$ apresentam maior permeabilidade. Além de sua distribuição no sistema nervoso central, nAChRs também foram encontrados em células imunes e de tecidos periféricos (FUCILE, 2017; GIASTAS et al., 2018).

A via anti-inflamatória colinérgica tem sido muito estudada em relação à sua função imunomoduladora e efeitos em processos infecciosos, incluindo sepse (WANG et al. 2011). A sepse é uma síndrome clínica induzida por infecção e caracterizada por uma reação inflamatória potente (PITTET et al., 1995). O modelo de sepse mais aceitável atualmente é produzido via cirurgia de ligadura e punção cecal (CLP), caracterizada pela ligação e perfuração do ceco, o que induz uma inflamação do peritônio com fisiopatologia e produção de citocinas comparáveis com a magnitude da sepse clínica (RITTIRSCH et al., 2008; DENG et al., 2017). Durante o desenvolvimento da sepse, a inflamação sistêmica e os danos observados são atribuídos ao lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular das bactérias Gram-negativas. O LPS age através do receptor TLR-4 induzindo a ativação de fatores de transcrição e a expressão de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-6 (POLTORAK, 1998; ZHANG & GHOSH, 2002).

Nesse contexto, estudos recentes de nosso laboratório mostraram que a curta exposição à dieta hiperlipídica reduz a expressão do receptor $\alpha 7$ nAChR no hipotálamo, culminando no aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias e no aumento da mortalidade após o desenvolvimento de sepse (SOUZA, 2019).

Por outro lado, recentemente, um outro mecanismo que pode afetar a ativação da NF- κ B foi identificado. GPR120 é um receptor de membrana celular acoplado à proteína G expresso em macrófagos, que pode se ligar à ácidos graxos poli-insaturados. Um agonista sintético do GPR120 inibiu a resposta de macrófagos à endotoxina, efeito que envolveu a proteção do I κ B citosólico e uma diminuição na produção de TNF- α e IL-6, sugerindo que o GPR120 está envolvido na sinalização anti-inflamatória (OH et al., 2010).

Portanto, devido aos efeitos benéficos dos ácidos graxos poli-insaturados pela ativação de mecanismos anti-inflamatórios, nossa hipótese de estudo foi que a

suplementação prévia com o ácido graxo $\omega 3$ possa prevenir os danos causados ao receptor $\alpha 7$ nAChR, pela curta exposição à dieta hiperlipídica, no hipotálamo de camundongos em modelo de sepse.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se a suplementação com o ácido graxo $\omega 3$ pode prevenir os danos causados no hipotálamo pelo consumo de dieta hiperlipídica no modelo de sepse, induzida por CLP, em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar a expressão hipotalâmica do receptor $\alpha 7$ nAChR por western blot, qPCR, imunofluorescencia;
- II. Quantificar mRNA para TNF α , IL-6 e IL-1 β por qPCR;
- III. Avaliar a expressão hipotalâmica das quimiocinas CXCL2, CX3CL1 e CCL2;
- IV. Quantificar a ativação de JNK e IKK no hipotálamo;
- V. Avaliar a sobrevida após desafio com a CLP.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Reflexo Anti-inflamatório

A resposta inflamatória estimulada na defesa do organismo contra agentes infecciosos é potente. Esta resposta necessita ser diminuída a fim de evitar danos para o próprio organismo. O sistema nervoso parassimpático é parte fundamental deste sistema de controle da intensidade da resposta inflamatória. Ele tem como um dos principais neurotransmissores a acetilcolina (ACh), que pode se ligar a receptores muscarínicos e nicotínicos. Este neurotransmissor participa do mecanismo de controle da resposta inflamatória conhecido como via anti-inflamatória colinérgica, a fim de evitar que a resposta exacerbada possa promover danos celulares (TRACEY, 2009).

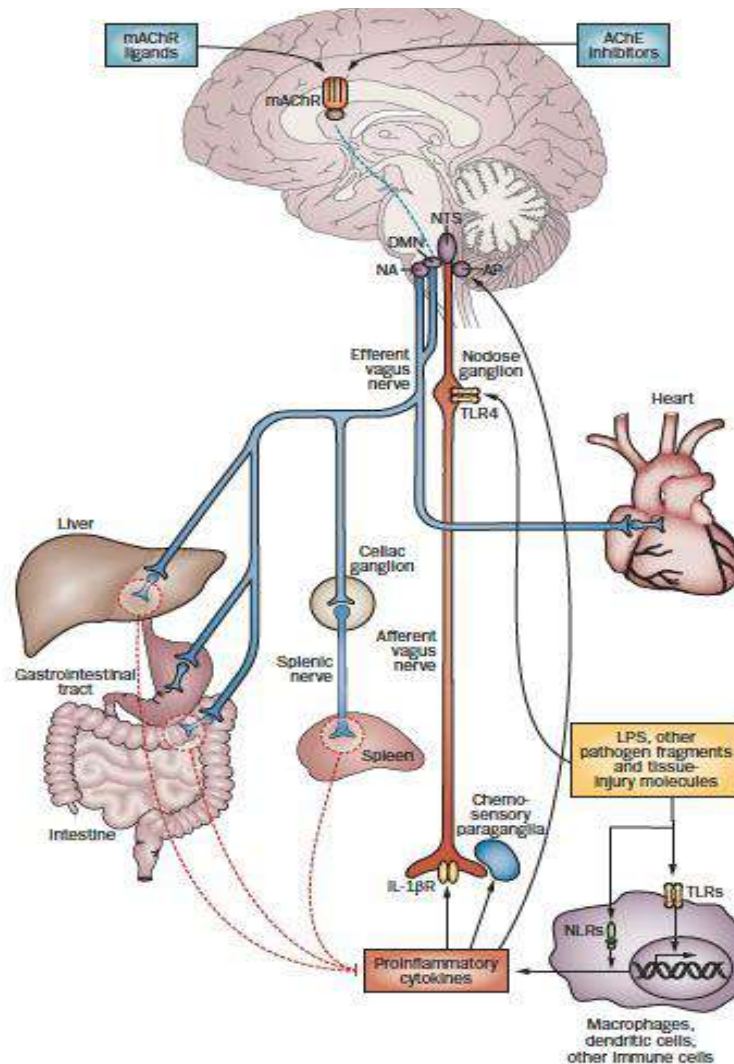
A acetilcolina é capaz de suprimir a produção de citocinas inflamatórias através da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR). Ela é degradada por enzimas como acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), principais colinesterases no cérebro e tecido adiposo, respectivamente (WANG et al., 2011). A ligação da acetilcolina ou de outro agonista ao $\alpha 7$ nAChR é capaz de ativar duas vias de transdução de sinal. A primeira seria a ativação da enzima adenilato ciclase que aumenta os níveis intracelulares de cAMP e ativa CREB, que induz a expressão de cFOS que por sua vez inibe a ativação de NFkB e a transcrição de citocinas inflamatórias (ANDERSSON & TRACEY, 2012). Já a segunda, refere-se à ativação das proteínas janus kinase 2 (JAK2) e transdutora de sinais e ativadora de transcrição 3 (STAT3) com inibição da migração de NFkB e expressão de citocinas inflamatórias (PAVLOV & TRACEY, 2012).

Estas duas vias fazem parte de um sistema mais complexo que tem reflexo sistêmico, diminuindo os níveis de citocinas inflamatórias (BOROVIKOVA et al., 2000). Este mecanismo foi denominado de reflexo anti-inflamatório colinérgico (Fig. 1) a partir de estudos desenvolvidos pelo grupo de Tracey (2000). A via anti-inflamatória colinérgica teve sua função primeiramente mostrada em macrófagos, mas atualmente sua atividade já foi demonstrada em outros tipos celulares (TREININ et al., 2017). De maneira resumida a via anti-inflamatória colinérgica se inicia com a detecção do aumento de citocinas por receptores localizados em neurônios sensoriais aferentes, que conduzem a informação até o SNC. Receptores muscarínicos localizados em diferentes regiões do SNC integram o sinal e o disparam através do braço eferente do

nervo vago responsável por liberar acetilcolina que ativa o receptor $\alpha 7$ AChR, reduzindo a síntese de TNF e ativação de macrófagos (TRACEY, 2009) (Fig. 1).

O reflexo anti-inflamatório colinérgico tem sido estudado como alvo terapêutico para doenças associadas com desordens nutricionais como obesidade, diabetes, desordens do SNC e sepse. (WANG et al., 2011; KALKMAN & FEUERBACH, 2016). Pavlov e colaboradores (2007), mostraram que uma estratégia para a redução de doenças inflamatórias, em camundongos, seria a ativação farmacológica do receptor $\alpha 7$ nAChR, pois essa leva à uma redução da produção de citocinas e ao aumento da sobrevivência em modelo de sepse induzida por CLP. De acordo com esses estudos, o receptor $\alpha 7$ AChR pode participar ativamente do controle de processos inflamatórios.

Figura 1 - Anatomia funcional do reflexo inflamatório.



Mediadores inflamatórios, como as citocinas, são liberados pela ativação de macrófagos ou outras células do sistema imune quando TLRs ou NLRs são ativados diante a um desafio imune. Esses mediadores são detectados por componentes sensoriais do braço aferente do reflexo inflamatório (vermelho). Interconexões neuronais entre as regiões NTS, AP, DMN, NA e regiões superiores do cérebro anterior (não mostradas) integram a sinalização aferente e saída imunoregulatória mediada pelo nervo vago eferente. A saída eferente colinérgica do nervo vago para o baço, fígado e trato gastrointestinal (azul) regula a ativação imune e suprime a liberação de citocinas pró-inflamatórias (linhas vermelhas pontilhadas). Esse braço colinérgico eferente do reflexo inflamatório pode ser ativado no cérebro através de mecanismos mediados por mACHR desencadeados por ligantes de mACHR e inibidores de AChE, como a galantamina. Abreviações: AChE, acetilcolinesterase; AP, área postrema. DMN, núcleo motor dorsal do nervo vago; LPS, lipopolissacarídeo (endotoxina); mACHR, receptor muscarínico de acetilcolina; NA, núcleo ambíguo, NLRs, receptores do tipo oligomerização de ligação a nucleotídeos; NTS, núcleo do trato solitário; TLR4, receptor toll-like 4. Fonte: Pavlov & Tracey (2012).

3.2 Dieta Hiperlipídica e Inflamação

Estudos mostram que uma dieta rica em lipídios saturados pode atuar alterando a sinalização da leptina e insulina por ativar o receptor TLR4 (*toll-like receptor 4*) no hipotálamo. Esta ativação induz uma cascata de sinalização que resulta na produção de citocinas inflamatórias tais como TNF- α , IL1 β (interleucina 1 β) e IL-6 (KIM & SEARS, 2010; VAN DE SANDE-LEE & VELLOSO, 2012; MILANSKI et al., 2009) que ativam serina-quinases, resultando em resistência hormonal a leptina e insulina, morte celular, indução de autofagia, entre outras alterações que estão associadas aos danos causados pela obesidade (DE SOUZA et al., 2005).

Recentemente, um estudo mostrou que o aumento na gravidade e mortalidade da sepse em camundongos alimentados com *western diet* é independente da modulação microbiana, mostrando que a dieta reprograma o estado basal do sistema imunológico e a resposta aguda da sepse induzida por LPS (NAPIER et al. 2019).

Os estudos de Thaler et al (2012) e Waise et al (2015) mostraram que o consumo de dieta hiperlipídica por curto período (3 dias), aumenta rapidamente a presença de marcadores pró-inflamatórios no hipotálamo. Nesse sentido, há estudos que relacionam a inflamação causada pela dieta hiperlipídica com a via anti-inflamatória colinérgica (THALER et al., 2012; WAISE et al., 2015). Estudos realizados em humanos, analisando o tecido adiposo subcutâneo, mostraram que a expressão do receptor $\alpha 7$ nAChR foi significativamente menor em indivíduos obesos em comparação com a de indivíduos eutróficos (CANCELLO et al., 2012). Os estudos realizados por Payolla et al (2016), em nosso laboratório, mostraram que o consumo materno de dieta rica em gordura afeta a resposta inflamatória da prole com a redução da expressão do receptor $\alpha 7$ nAChR.

Utilizando o mesmo modelo de Thaler et al (2012) e Waise et al (2015), uma pesquisa do nosso laboratório mostrou que há diminuição da expressão do receptor $\alpha 7$ nAChR em células da medula óssea e do número total de células no nicho hematopoiético de camundongos expostos à três dias de dieta hiperlipídica (SOUZA et al., 2019). Concomitantemente, essa diminuição significativa da expressão do receptor $\alpha 7$ nAChR também foi observada no hipotálamo, tornando-o mais susceptível a danos inflamatórios, como observado pelo aumento da expressão de TNF α , IL-6 e IL-1 β após desafio com LPS e pelo aumento da mortalidade nos dois modelos de

sepsis estudados. Por outro lado, o agonista seletivo do receptor $\alpha 7$ nAChR reduziu a potência da resposta inflamatória (SOUZA et al., 2019).

Dessa maneira, esses resultados sugerem que o prejuízo causado pela dieta hiperlipídica, além de estar associado à ativação de vias inflamatórias, possivelmente se relaciona com danos no controle da resposta anti-inflamatória colinérgica, antes mesmo do desenvolvimento da obesidade.

3.3 Ômega 3 e o Efeito Anti-inflamatório

Os ácidos graxos desempenham importantes funções na estrutura de membranas celulares e nos processos metabólicos. O ácido alfa-linolênico (18:3 ω -3, ALA) é necessário principalmente para manter as membranas celulares, funções cerebrais e transmissão de impulsos nervosos em condições normais. O ALA é denominado ácido graxo poli-insaturado por apresentar mais de uma insaturação (INNIS, 2003).

Estudos tem demonstrando que, como alternativa para redução da inflamação, os ácidos graxos poli-insaturados provenientes da alimentação têm importante papel anti-inflamatório, desempenhando esse papel através da ativação do receptor GPR120 (CALDER et al., 2011; DE BOER et al., 2016). O receptor GPR120 está presente na membrana de macrófagos e células de Kupffer e está acoplado à proteína G. Este receptor é sensível a lipídios, com destaque aos ácidos graxos ω 3 de cadeia longa poli-insaturados, como EPA (Ácido Eicosapentanoico, C20:5) e DHA (Ácido docosa-hexaenóico, C22:6) e, quando ativado, exerce efeito anti-inflamatório (OH et al., 2010).

Nesse sentido, estudos também mostraram que ácidos graxos insaturados modulam a expressão de citocinas e impedem o desenvolvimento de resistência à insulina em resposta à alimentação *high fat* (CHACIŃSKA et al., 2019; O'MAHONEY et al., 2018). Também foi mostrado que a ativação da sinalização pró-inflamatória em macrófagos intraperitoneais por agonistas de TLR4/2 ou TNF- α , é inibida pelo pré-tratamento de ácido graxo sugerindo que o ácido graxo está envolvido na sinalização anti-inflamatória (OH et al., 2010). Apesar desses achados, ainda não foi investigado se há relação dos efeitos anti-inflamatórios dos ácidos graxos poli-insaturados com a via anti-inflamatória colinérgica em resposta à agentes pró-inflamatórios.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

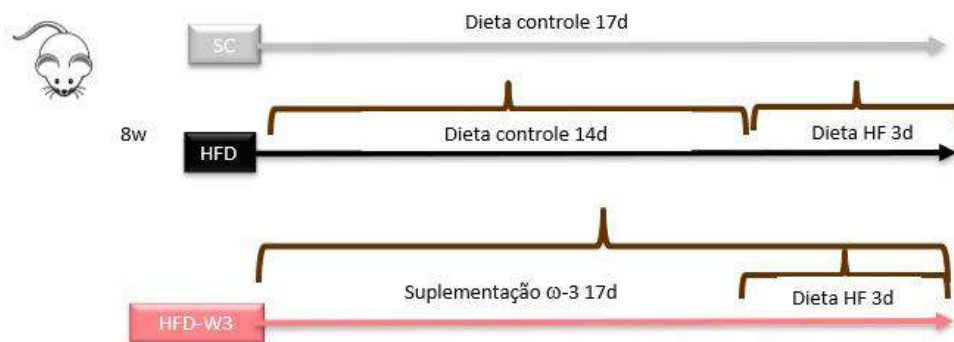
4.1 Animais e desenho experimental

A investigação foi conduzida de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob o nº 4958-/2018.

Utilizou-se camundongos, machos, *Mus Musculus*, da linhagem *Swiss*, com 8 semanas de vida, obtidos da colônia do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram mantidos, no biotério com ciclo de luz de 12 horas (claro/escuro) e com temperatura controlada (22-24°C), em gaiolas individuais e com livre acesso a água e ração.

Os camundongos foram randomicamente distribuídos em três grupos: SC – dieta controle, HFD – dieta hiperlipídica, durante 3 dias e HFD (3 dias) + suplementação com ômega 3, durante 17 dias (Fig. 2).

Figura 2 - Esquema 1 com a divisão dos grupos experimentais

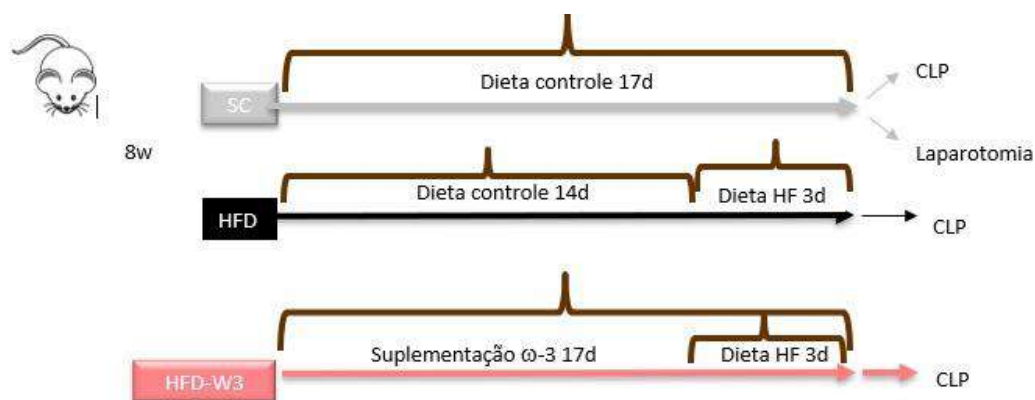


Após o período suplementação e dieta, o grupo controle foi subdividido em dois grupos: um que recebeu apenas a cirurgia de laparotomia e o segundo a cirurgia de CLP. Os camundongos dos outros dois grupos, HFD e HFD suplementado, foram todos submetidos a cirurgia de CLP (Fig. 3). Desta maneira, os grupos ficaram assim constituídos:

- 1- **SC-SHAM**: dieta controle e apenas a laparotomia sem a CLP;
- 2- **SC-CLP**: dieta controle e submetido ao desafio da CLP;
- 3- **HFD-CLP**: dieta HFD (3 dias) e submetido ao desafio da CLP;

4- **HFD ω 3-CLP**: suplementado com ômega 3 (17 dias) e consumo de HFD (3 dias) e submetido ao desafio da CLP.

Figura 3 - Esquema 2 com a divisão dos grupos experimentais.



4.1.1 Dieta

Foram utilizadas dieta comercial e dieta hiperlipídica contendo 60% de gordura, que foram oferecidas aos animais na forma de “pellets”, conforme a composição demonstrada na tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional da dieta hiperlipídica e da dieta comercial (padrão) que foram empregadas nos protocolos experimentais

	Comercial ¹	Hiperlipídica	
Proteína bruta (g %)	22,5	20,8	¹
Extrato etéreo (gordura) (g %)	4,5	23,6	
Carboidratos (g %)	55,0	41,2	
Fibra bruta (g %)	8,0	5,8	
Cinzas (g %)	10,0	8,6	
Total	100,0	100,0	
Kcal/g	3,5	4,6	

¹(NUVILAB® Cr-1, Nuvital, PR - Brasil)

4.1.2 Suplementação

Os animais foram suplementados por 17 dias consecutivos com ácido graxo ω 3 (2g/kg de peso ou 4g/kg de peso) por via oral. A fonte de ômega 3 foi óleo

de peixe (EPA:DHA: 5:4) proveniente da marca Naturalis®. A dosagem de óleo de peixe foi escolhida com base em estudos anteriores não publicados de nosso grupo e estudos de outros grupos (AMARAL, et al. 2014). Os grupos HFD ω 3 e HFD ω 3-CLP receberam a HFD no 15º, 16º e 17º dia.

4.1.3 Anestesia

Para o procedimento de extração do hipotálamo os camundongos receberam uma mistura contendo quetamina (100 mg/kg de peso do animal) e xilazina (10 mg/kg de peso do animal).

4.2 Cirurgia de Ligadura e Punção Cecal – CLP

Após o período experimental com a dieta, os animais foram anestesiados com 5% de isoflurano e a indução da sepse severa deu-se através do procedimento de CLP. A CLP consistiu na perfuração cecal e extravasamento do conteúdo fecal na cavidade peritoneal, gerando resposta imune exacerbada em resposta à infecção. Parte dos animais foram submetidos apenas a incisão de laparotomia (apenas exposição do ceco, sem perfuração - SHAM). 24 horas após a cirurgia os animais foram sacrificados para obtenção do hipotálamo de acordo com tempos que foram previamente determinados.

4.3 Western Blotting

As amostras de hipotálamo foram homogeneizadas em solução de tampão de imunoprecipitado (Tris 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio; 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina e por fim, foi adicionado Triton X-100 a 10 % do volume do tampão), com auxílio de um homogeneizador de tecido (Bead Ruptor®, Omni International, Kennesaw, GA, EUA). Ao final da homogeneização, as amostras foram submetidas à centrifugação, com velocidade de 12000 rpm por 30 minutos, a 4°C, a fim de remover o material insolúvel. Somente o sobrenadante foi utilizado para dosagem do conteúdo proteico total, pelo método colorimétrico de Bradford.

Posteriormente, o sobrenadante foi suspenso em tampão de amostra Laemmli + betamercapto (1M de fosfato de Na com pH 7,0, 0,1% de azul de bromofenol, 50% de glicerol, 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 5% de mercaptoetanol) e armazenado a -20°C. As amostras em tampão de Laemmli, após

rápida fervura, foram aplicadas em géis de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE), usando um aparelho de gel (BioRad, Richmond, CA, EUA). A transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada durante 10 min no sistema de transferência Trans-Blot® Turbo™ (Biorad). Após essa etapa, as membranas foram então bloqueadas com solução contendo 5% de leite desnatado ou albumina diluídos em solução basal (20 ml Trisma base 1M, 60 ml NaCl 5M, 10% de Tween 20, 2 L de água deionizada) durante 2 horas em temperatura ambiente.

Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram incubadas, durante a noite, com anticorpos específicos: α 7nAChR (bs-1049R) da Bioss Antibodies, p-IKK (#2697S), p-NF- κ B (#3033S), p-JNK (#4255S) e NF- κ B (#8242S) da Cell Signalling, e GAPDH (T5168) da Santa Cruz como controle endógeno. No dia seguinte, as membranas foram incubadas, em temperatura ambiente por 2 horas, com anticorpos secundários Rabbit ou Mouse, a depender do primário, (diluídos em solução basal com 3% de leite desnatado). Por fim, as bandas foram detectadas por quimiluminescência com kit SignalFire™ ECL reagent (Cell Signaling, 6883S) e posterior exposição no fotodocumentador (Sygenne). No mais, a intensidade da banda foi determinada pelo software Scion e os resultados são expressos como a razão entre proteína específica e endógena (GAPDH).

4.4 Real Time PCR

Sob condições estéreis e livres de RNases, as amostras de hipotálamo foram utilizadas para extração de RNA total com reagente Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O RNA total foi extraído, precipitado em álcool isopropílico e lavado com álcool etílico (75% e 100%). A concentração e a pureza do RNA foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop ND-2000 -Thermo Electron, WI, EUA), a 260nm (A260) e a 280 nm (A280), e a integridade do RNA isolado pela razão A260:A280 por espectrofotometria a 260 nm (A260) e a 280 nm (A280). Os níveis de mRNA das amostras foram analisados pela técnica de transcrição reversa (RT-qPCR) utilizando o kit Hight-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). O cDNA foi sintetizado a partir do mRNA utilizando 3 μ g da amostra de RNA total. O RT-qPCR foi realizado em um sistema de detecção de seqüências ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). Posteriormente, determinou-se a expressão relativa usando os primers com sistema de detecção TaqMan para os genes alvo. Os primers utilizados

foram obtidos da Applied Biosystems *Chrna7* (Mm01312230_m1), TNF- α (Mm00443258m1), IL-6 (Mm00446190m1), CXCL2 (Mm00436450m1), CCL2 (Mm00441242m1) e CX3CL1 (Mm00436454m1) e utilizou-se o primer beta-actina (4351315) como controle endógeno. Cada PCR continha 20 ng de RNA de transcrição reversa e foi corrido de acordo com a recomendação do fabricante usando a Mistura Principal de PCR TaqMan (AppliedBiosystems). A expressão do mRNA alvo foi normalizada pela expressão da beta-actina e expressa como um valor relativo usando o método do ciclo limiar comparativo (Ct) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 Imunofluorescência

Os animais foram perfundidos com PBS 0,1M seguido de PFA 4%. O cérebro foi extraído e fixado em PFA 4%. Então, foram fixados em Tissue-Tek (Sakura, Torrance, CA, USA), congelados e seccionados, em cortes coronais a 15 μ m de espessura. Os cortes foram incubados com solução de bloqueio (3% Donkey serum; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) por 90 minutos, seguidos de incubação, overnight a -4°C, com anticorpos primários específicos. Os anticorpos primários utilizados foram anti-F4/80 1:500 (ab6640 – Abcam) e anti- $\alpha 7$ nAChR 1:50 (ab23832 - Abcam). Posteriormente, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários apropriados por 90 min. Os anticorpos secundários usados foram Alexa 488-conjugado donk anti-rabbit 1:500 (ab21208 – Abcam) e Alexa 594 – conjugado goat anti-mouse 1:500 (ab11032- Abcam). TO-PRO-3 foi utilizado como marcador nuclear (1:1000 – Life Technologies). As lâminas foram montadas usando Prolong (Invitrogen) e fotografadas por microscopia de fluorescência Leica Leica DMI400 B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Germany).

4.6 Análises Estatísticas

Os resultados são apresentados em média $\pm$ SD. Para a comparação de médias entre os grupos, aplicamos a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido de Tukey. GraphPad Prism 5 foi o software aplicado a todas as análises estatísticas. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

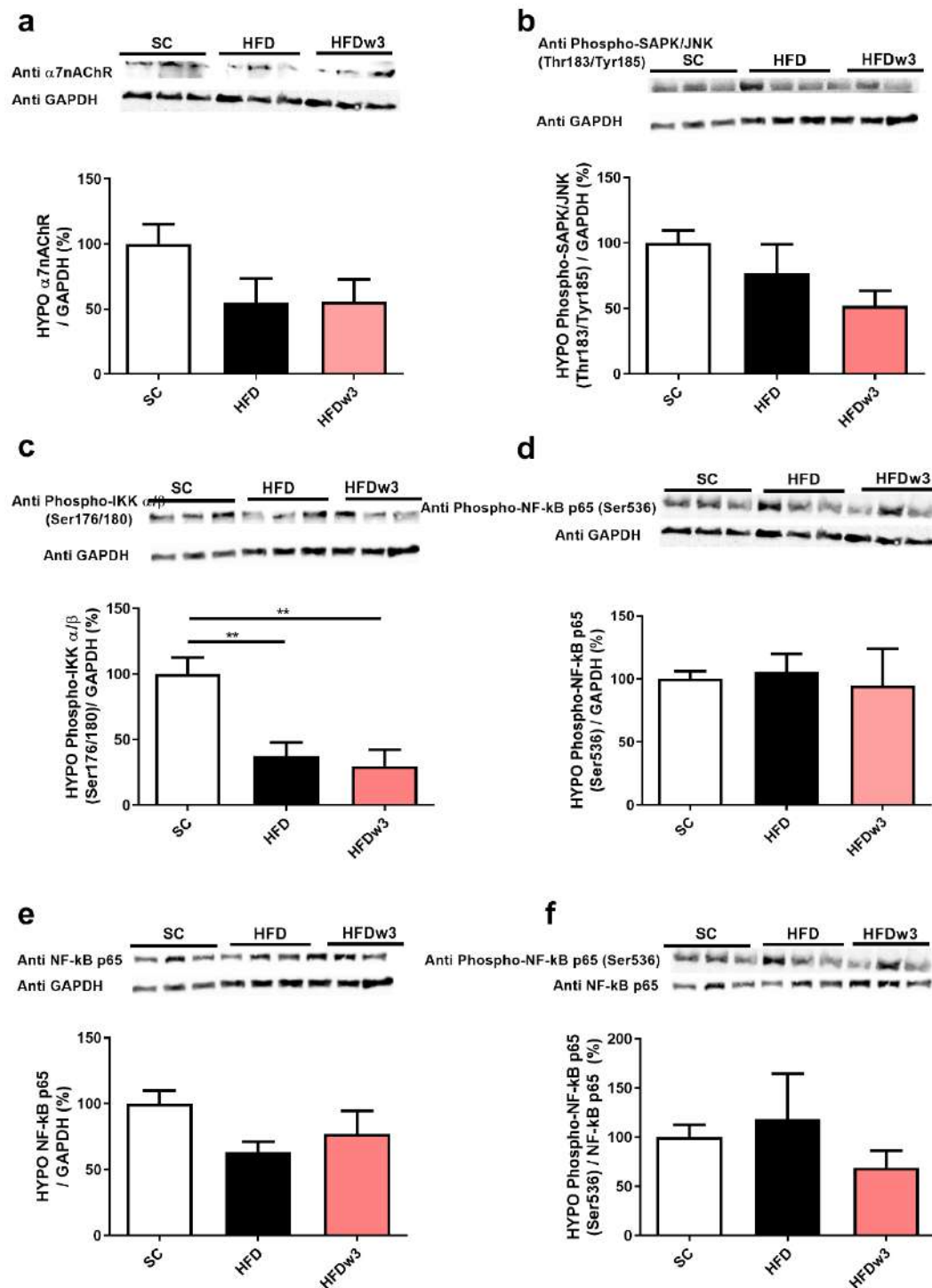
5.1 Avaliação de parâmetros inflamatórios mediante exposição à dieta hiperlipídica e suplementação $\omega 3$.

Camundongos Swiss machos de 7 semanas foram divididos em três grupos o primeiro recebeu dieta comercial padrão (SC), o segundo recebeu dieta hiperlipídica 60% por três dias (HFD) e o terceiro recebeu a suplementação via oral de $\omega 3$ por 17 dias e dieta hiperlipídica 60% no 15º, 16º e 17º dia (HFD $\omega 3$).

Nossos resultados, apesar de não significativos, demonstram que a exposição à dieta hiperlipídica por 3 dias parece reduzir sutilmente o conteúdo proteico do receptor $\alpha 7nAChR$ e a suplementação com ômega 3 não reverteu este efeito (Fig. 4A). Essa análise corrobora com os resultados encontrados por Souza et al (2019) que observou haver uma diminuição significativa no conteúdo proteico do receptor no hipotálamo de camundongos que consumiram uma HFD por três dias.

Em relação aos marcadores inflamatórios observamos que a proteína JNK não apresentou diferença no nível de fosforilação entre os grupos, mostrando que a exposição direta à curto prazo e a suplementação com o ácido graxo $\omega 3$ não foram capazes de modular seu conteúdo (Fig. 4B). Quanto ao nível de pIKK, houve uma diminuição de seu conteúdo proteico no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica por 3 dias e no grupo HFD $\omega 3$ (Fig. 4C). Também avaliamos o conteúdo proteico de pNF-kB e NF-kB e nenhuma diferença foi observada entre os grupos (Fig. 4D e E). Entretanto, a relação pNF-kB/NF-kB (Fig. 4F) mostrou-se sutilmente aumentado no grupo HFD e diminuída no grupo HFD $\omega 3$. Esta dificuldade de encontrar diferenças entre os marcadores é possivelmente decorrente ao estado inflamatório de baixo grau característico da exposição a dieta (DING, 2010). Mas, consideramos esta caracterização importante para determinação dos próximos passos do estudo.

Figura 4 - Avaliação do conteúdo proteico de marcadores inflamatórios no hipotálamo.

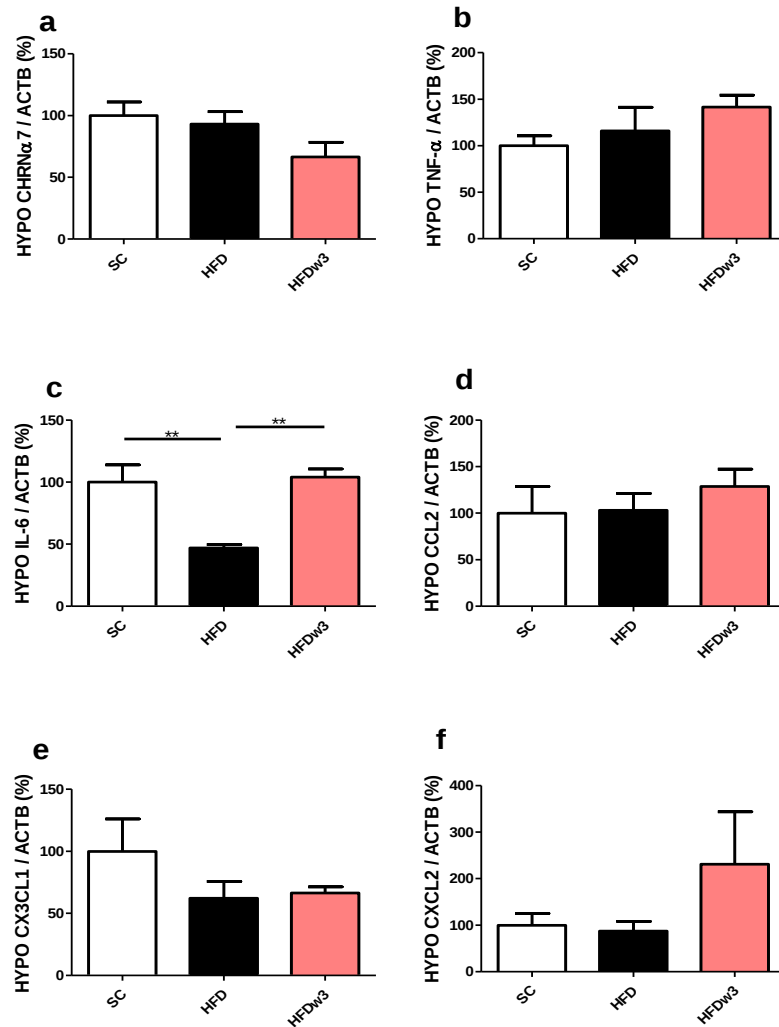


Os camundongos Swiss machos de 7 semanas receberam dieta controle (SC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 3 dias ou dieta hiperlipídica por 3 dias em conjunto com a suplementação de $\omega 3$ por 17 dias (HFDw3). Foi avaliado por imunoblotting **A**: $\alpha 7$ (SC,n=3; HFD,n=3; HFDw3,n=3) **B**: pNF- κ B (SC,n=3; HFD,n=3; HFDw3,n=3) **C**: pJNK (SC,n=3; HFD,n=3; HFDw3,n=3) **D**: pIKK (SC,n=3; HFD,n=3; HFDw3,n=3) **E**: NF- κ B (SC,n=3; HFD,n=3; HFDw3,n=3) **F**: pNF- κ B/NF- κ B (SC,n=3; HFD,n=3; HFDw3,n=3). A quantidade de proteína foi normalizada pelo endógeno GAPDH. As barras representam a média do grupo e $\pm$ o desvio padrão da média. Para comparação, foi utilizado o teste one-way ANOVA. ** $p < 0,01$.

A expressão do receptor *Chrna7* foi avaliada medindo os níveis de mRNA e os resultados encontrados corroboram com os observados em relação ao conteúdo proteico. A expressão gênica do *Chrna7* apresentou uma tendência de diminuição no grupo HFD e a manutenção dessa diminuição no grupo suplementado com $\omega 3$ (Fig. 5 A). Quanto a expressão gênica de citocinas inflamatórias, observamos que a expressão de TNF α não foi modulada pela dieta hiperlipídica ou pela suplementação com $\omega 3$ (Fig.5B). Já a expressão de IL-6 apareceu diminuída no grupo HFD, sendo a suplementação com $\omega 3$ capaz de reverter essa diminuição (Fig. 5C). Tínhamos como objetivo avaliar a expressão de IL-1 β no entanto no procedimento de *Real Time PCR* não obtivemos amplificação do gene. Em relação às quimiocinas CCL2, CX3CL1 e CXCL2, os resultados mostram que a exposição à dieta e à suplementação com o ácido graxo $\omega 3$ não foram capazes de modulá-las (Fig.5 D, E e F).

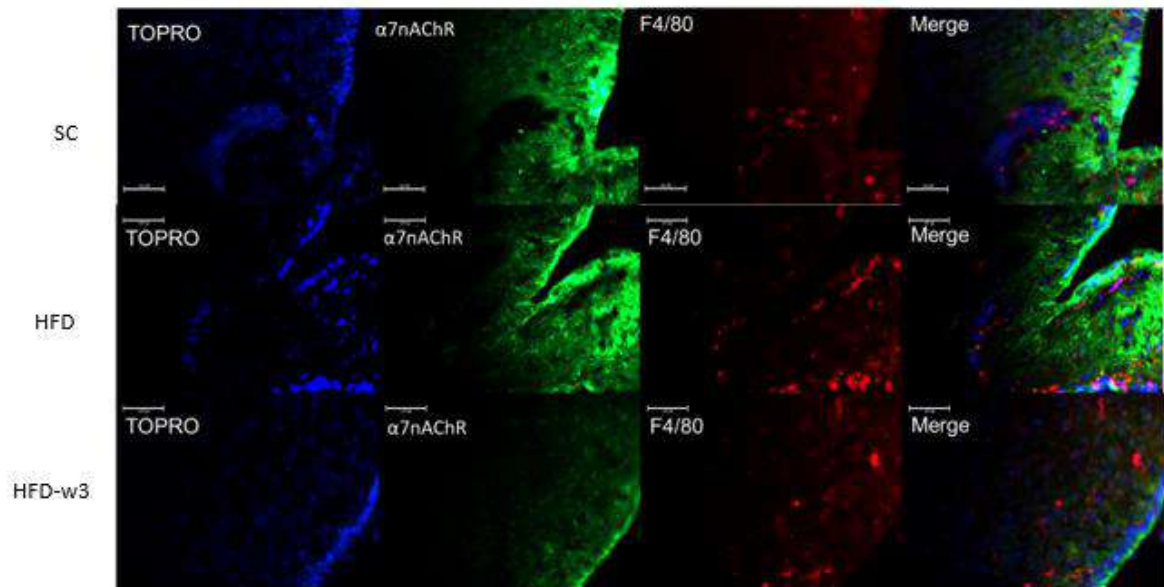
Através de imunofluorescência de microscopia, analisamos a quantidade total de células que expressam o receptor $\alpha 7$ nAChR e, por meio do marcador F4/80, analisamos a presença de macrófagos. Em relação ao receptor $\alpha 7$ nAChR, a marcação não foi eficaz e a fluorescência não foi detectada. Contudo, em relação ao marcador F4/80, podemos perceber aumento na marcação nos grupos HFD comparado ao SC, e uma tendência à diminuição nos animais que consumiram a HFD, mas que foram suplementados com o ácido graxo ômega 3 (Fig. 6).

Figura 5 - Avaliação da expressão gênica de citocinas e quimiocinas no hipotálamo.



Camundongos Swiss machos de 7 semanas receberam dieta controle (SC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 3 dias ou dieta hiperlipídica por 3 dias em conjunto com a suplementação de $\omega 3$ por 17 dias (HFDw3). **A:** CHRNA7 (SC,n=5; HFD,n=5; HFDw3,n=5) **B:** TNF α (SC,n=5; HFD,n=5; HFDw3,n=5) **C:** IL-6 (SC,n=5; HFD,n=5; HFDw3,n=5) **D:** CXCL3 (SC,n=5; HFD,n=5; HFDw3,n=5) **E:** CCL2 (SC,n=5; HFD,n=5; HFDw3,n=5) **F:** CXCL2 (SC,n=5; HFD,n=5; HFDw3,n=5). A quantidade de mRNA foi normalizada pelo endógeno ACTB. As barras representam a média do grupo e $\pm$ o desvio padrão da média. Para comparação, foi utilizado o teste one-way ANOVA. ** $p < 0,01$.

Figura 6 - Imunofluorescência de confocal em secções coronais do cérebro.

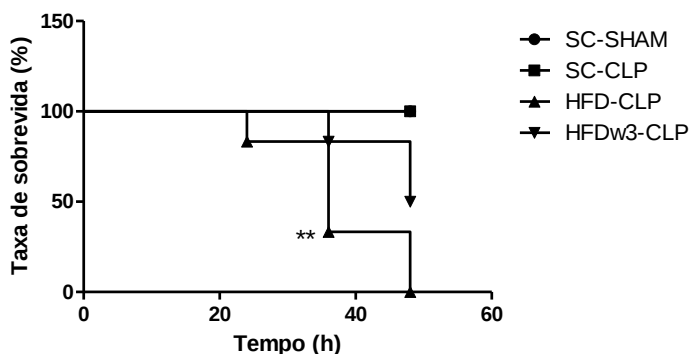


Os camundongos Swiss machos de 7 semanas receberam dieta controle (SC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 3 dias ou dieta hiperlipídica por 3 dias em conjunto com a suplementação de $\omega 3$ por 17 dias (HFDw3). Marcação de núcleo com TOPRO3 (azul), marcador para macrófago F4/80 (vermelho) e marcação do receptor $\alpha 7nAChR$ (verde).

5.2 Efeitos da suplementação com $\omega 3$ em parâmetros inflamatórios de camundongos expostos a sepse.

Posteriormente, induzimos a sepse por CLP, obtendo os grupos SC-SHAM, SC-CLP, HFD-CLP e HFD $\omega 3$ -CLP. Para identificar qual grupo alimentado com HFD era mais propenso ao desenvolvimento de sepse, as curvas de sobrevivência desses grupos foram comparadas (Fig. 7). Observamos que os animais SC-SHAM e SC-CLP não morreram após o procedimento, mas todos os animais HFD-CLP morreram em até 48 horas após a cirurgia. Em contrapartida, a suplementação resultou em apenas 50% de morte dos animais HFD $\omega 3$ -CLP até 48 horas após a cirurgia. Os 50% restantes permaneceram vivos até depois de 60 horas de observação (Tabela 2). Esse resultado mostrou que o grupo suplementado com ácido graxo ômega 3 foi capaz de reduzir o risco de mortalidade associado ao desenvolvimento da sepse, demonstrando papel importante do ômega 3 na prevenção da morte causada pela sepse. Os efeitos anti-inflamatórios do ácido graxo diminuíram significativamente o dano causado pela dieta HFD no mesmo modelo apresentado por Souza et al (2019).

Figura 7 - Taxa de sobrevivência.

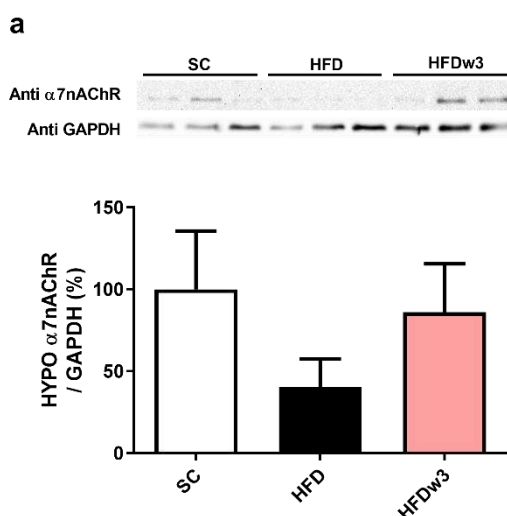


Os camundongos Swiss machos de 7 semanas receberam dieta controle (SC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 3 dias ou dieta hiperlipídica por 3 dias em conjunto com a suplementação de $\omega 3$ por 17 dias (HFDw3) e foram submetidos a laparotomia (SC-SHAM n=5) ou à CLP (SC-CLP n=5; HFD-CLP n=6; HFDw3-CLP n=6). O gráfico representa a porcentagem de sobrevivência por hora de cada grupo. Para comparação foi utilizado o log-rank test. **p<0,001.

Tabela 2 - Número de animais vivos por hora em cada grupo após desafio com CLP

TEMPO/GRUPO	SC-SHAM	SC-CLP	HFD-CLP	HFDw3-CLP
12 horas	5	5	6	6
24 horas	5	5	5	6
36 horas	5	5	2	5
48 horas	5	5	0	3
60 horas	5	5	0	3

Como os efeitos da suplementação na dose inicial foram pequenos, nós testamos paralelamente uma dose adicional (4g/kg) da suplementação com ácido graxo $\omega 3$ em nossos grupos e analisamos o conteúdo proteico de $\alpha 7nAChR$. Com a nova dose, os níveis proteicos de $\alpha 7nAChR$ no grupo HFDw3 aumentaram, mas o efeito não foi significativo em relação ao grupo HFD, o que pode ser resultado do número reduzido de animais por grupo utilizado para o experimento (Fig. 8A)

Figura 8 - Avaliação do conteúdo proteico do receptor $\alpha 7nAChR$ no hipotálamo.

Os camundongos Swiss machos de 7 semanas receberam dieta controle (SC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 3 dias ou dieta hiperlipídica por 3 dias em conjunto com a suplementação de $\omega 3$ (4g/kg) por 17 dias (HFDw3). Foi avaliado por imunoblotting A: $\alpha 7$ (SC,n=3; HFD,n=3; HFDw3,n=3). A quantidade de proteína foi normalizada pelo endógeno GAPDH. As barras representam a média do grupo e $\pm$ o desvio padrão da média. Para comparação, foi utilizado o teste one-way ANOVA.

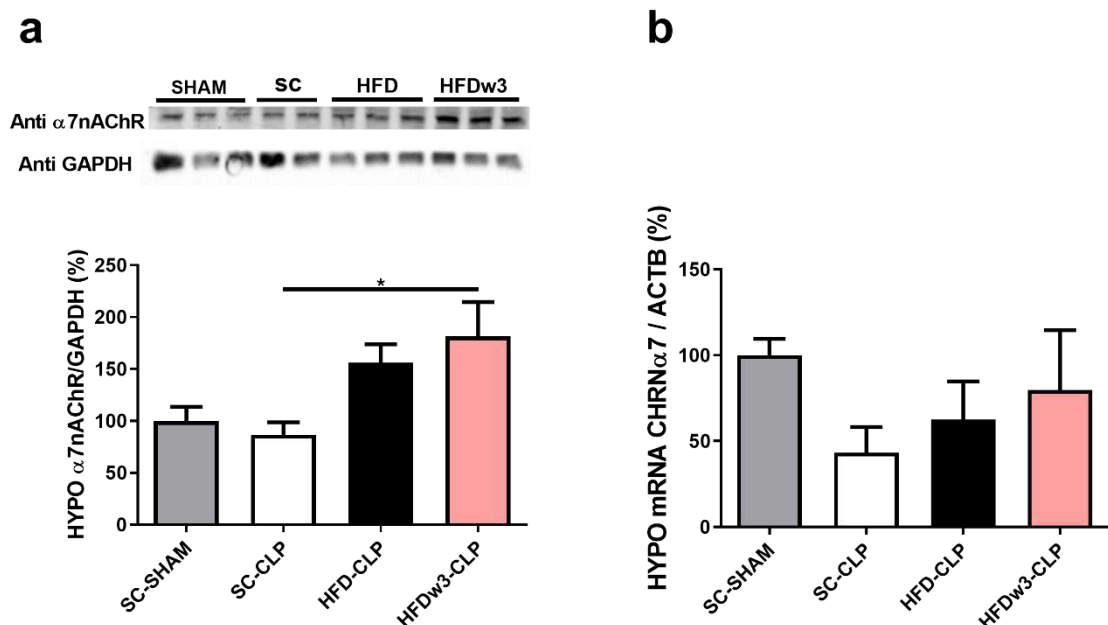
A nível basal, a avaliação dos marcadores inflamatórios sem estímulo não foi alterada significativamente. Assim, induzimos a sepse através da cirurgia CLP e a nova dose de suplementação foi empregada.

Nossos resultados mostram que a suplementação prévia com ômega 3 aumenta o conteúdo proteico do receptor $\alpha 7nAChR$ (Fig. 9A). Através da técnica RT-qPCR, os níveis de mRNA para o receptor $\alpha 7nAChR$ nos grupos foram medidos para

avaliar a expressão do gene *Chrna7* e de citocinas e quimiocinas. Contudo, obtivemos um problema durante a extração de RNA das amostras, resultando em uma baixa dosagem de RNA dos grupos com cirurgia CLP, o que nos permitiu avaliar somente a expressão do receptor *Chrna7* (Fig.9B). A expressão do receptor *Chrna7* nesse modelo aumentou de forma não significativa no grupo suplementado.

Esse aumento causado pela presença do ômega 3 se relaciona com os efeitos anti-inflamatórios encontrados por Oh et al (2010) e, sugere que, diante da sepse, o ômega 3 é capaz de ativar o reflexo anti-inflamatório colinérgico.

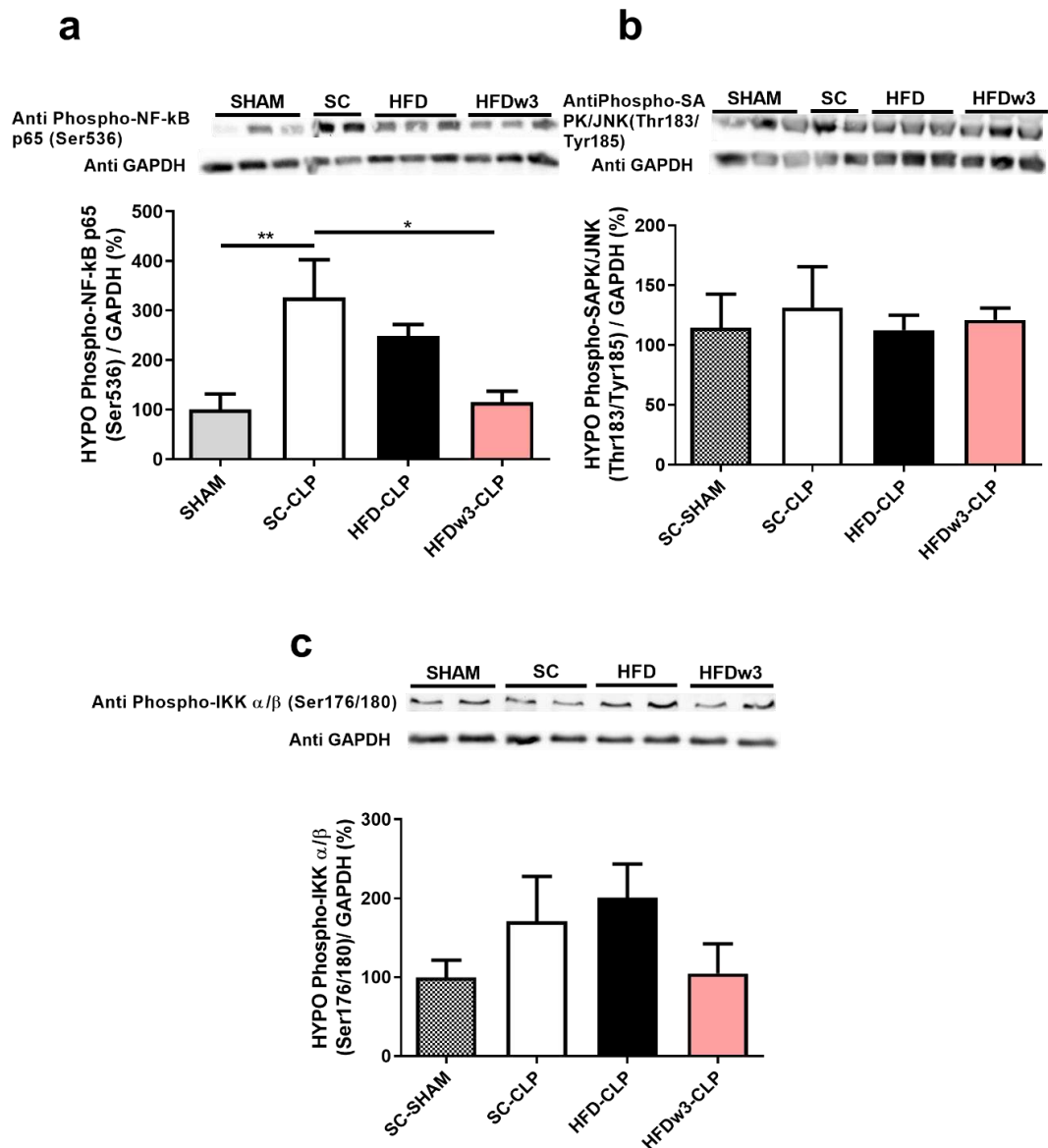
Figura 9 - Avaliação do conteúdo proteico e do conteúdo de RNAm do receptor $\alpha 7$ nAChR no hipotálamo.



Os camundongos Swiss machos de 7 semanas receberam dieta controle (SC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 3 dias ou dieta hiperlipídica por 3 dias em conjunto com a suplementação de $\omega 3$ por 17 dias (HFDw3) e foram submetidos a laparotomia (SC-SHAM) ou à CLP (SC-CLP; HFD-CLP; HFDw3-CLP). **A:** $\alpha 7$ (SC-SHAM, n=5; SC-CLP n=4; HFD-CLP, n=5; HFDw3-CLP n=5). A quantidade de proteína foi normalizada pelo endógeno GAPDH. **B:** CHRN $\alpha 7$ (SC-SHAM, n=5; SC-CLP n=4; HFD-CLP, n=5; HFDw3-CLP n=4). A quantidade de mRNA foi normalizada pelo endógeno ACTB. As barras representam a média do grupo e $\pm$ o desvio padrão da média. Para comparação, foi utilizado o teste one-way ANOVA. * $p < 0,05$

Analizamos também por *immunoblotting* a fosforilação do fator de transcrição NF κ B. Como poder ser observado na figura 10A, no grupo SC-CLP a fosforilação do NF κ B foi maior comparado ao grupo SHAM-CLP. Mas o consumo de HFD não alterou o efeito da CLP. Contudo, quando os animais foram suplementados (HFD ω 3-CLP) ocorreu uma redução importante da fosforilação do NF- κ B. O fator de transcrição NF- κ B está associado à expressão de citocinas inflamatórias e distúrbios metabólicos (JU HWANG, 2019). Essa diminuição pode ser associada ao aumento do conteúdo proteico do receptor α 7nAChR promovido pela suplementação, como indicado pela figura 9. De acordo com a literatura, o aumento de α 7nAChR tem um papel na inibição da translocação nuclear desse fator de transcrição (ANDERSSON & TRACEY, 2012). Em relação aos marcadores inflamatórios JNK e IKK, observamos que a exposição direta a curto prazo e a suplementação com o ácido graxo ω 3 não foram capazes de modular os níveis de fosforilação destas proteínas (Fig. 10 B e C).

Figura 10 - Avaliação do conteúdo proteico de marcadores inflamatórios no hipotálamo.

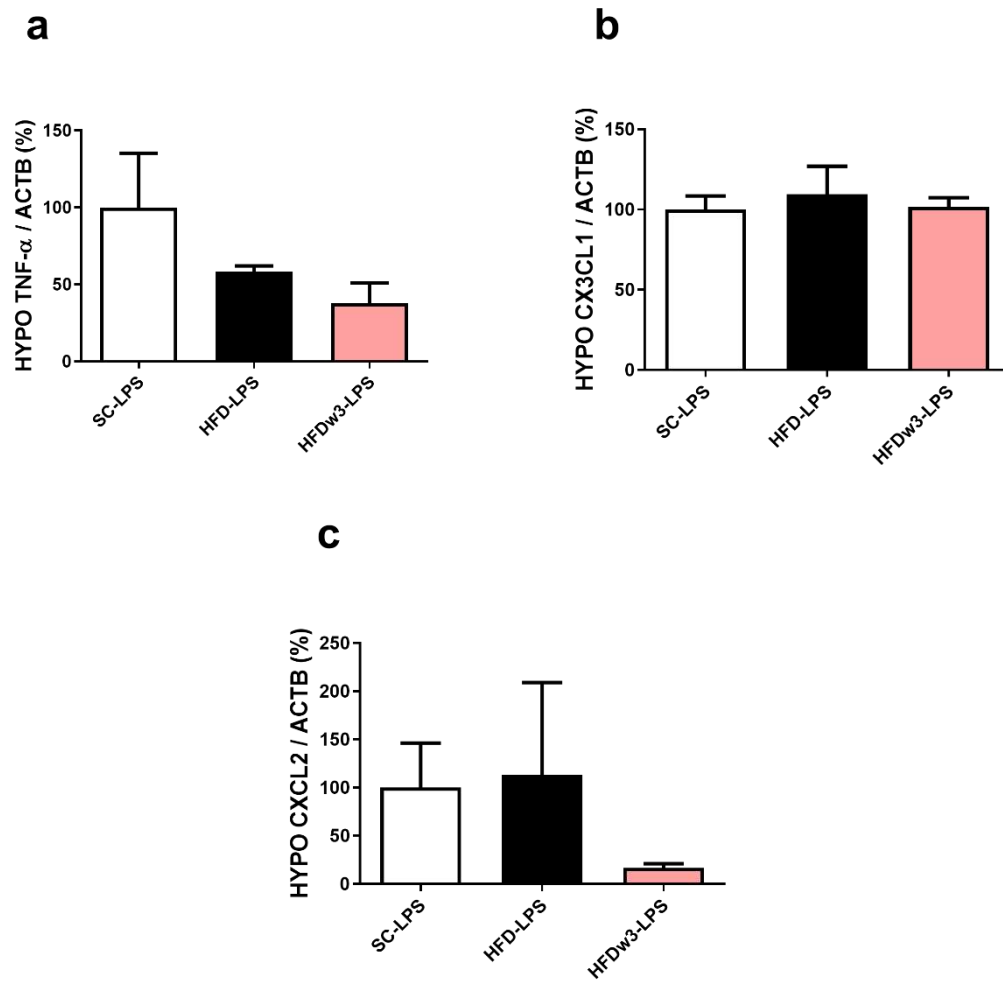


Os camundongos Swiss machos de 7 semanas receberam dieta controle (SC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 3 dias ou dieta hiperlipídica por 3 dias em conjunto com a suplementação de ω 3 por 17 dias (HFDw3) e foram submetidos a laparotomia (SC-SHAM) ou à CLP (SC-CLP; HFD-CLP; HFDw3-CLP). Foi avaliado por Imunoblotting **A**: pNF- κ B (SC-SHAM, n=5; SC-CLP n=4; HFD-CLP, n=5; HFDw3-CLP n=5) **B**: pJNK (SC-SHAM, n=5; SC-CLP n=4; HFD-CLP, n=5; HFDw3-CLP n=5) **C**: pIKK (SC-SHAM, n=5; SC-CLP n=4; HFD-CLP, n=5; HFDw3-CLP n=5). A quantidade de proteína foi normalizada pelo endógeno GAPDH. As barras representam a média do grupo e $\pm$ o desvio padrão da média. Para comparação, foi utilizado o teste one-way ANOVA. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Paralelamente a este estudo, o laboratório também tem usado um modelo experimental similar, onde os grupos SC, HFD e HFD ω 3 são submetidos ao desafio com LPS para a indução da sepse. Assim, extraímos o tecido hipotalâmico desses grupos para a realização da técnica RT-qPCR e avaliação de alguns alvos de maior interesse. A expressão da citocina TNF- α (Fig.11A) e das quimiocinas CX3CL1 e CXCL2 (Fig.11B e C) mostraram uma tendência de aumento no grupo HFD e de diminuição no grupo que recebeu o ácido graxo ômega 3. Em vista da marcação para o receptor α 7nAChR não ter sido eficaz, para os grupos SC-SHAM, SC-CLP, HFD-CLP e HFD ω 3-CLP a técnica de imunofluorescência não foi realizada.

Nossos resultados mostraram que, a suplementação com ω 3 é capaz de reduzir significativamente vários marcadores inflamatórios no hipotálamo. Estes efeitos foram observados juntamente com o aumento da expressão do receptor α 7nAChR no hipotálamo após a suplementação. Assim, de acordo com os resultados mostrados por nosso grupo previamente (SOUZA et al., 2019) em que os animais HFD3d foram mais susceptíveis a inflamação e apresentaram menor expressão do receptor α 7nAChR, aqui nós mostramos que a suplementação preveniu os efeitos deletérios do consumo de dieta HFD3d.

Figura 11 - Avaliação por RTq-PCR do conteúdo de mRNA de citocinas no hipotálamo.



Os camundongos Swiss machos de 7 semanas receberam dieta controle (SC) ou dieta hiperlipídica (HFD) por 3 dias ou dieta hiperlipídica por 3 dias em conjunto com a suplementação de ω 3 por 17 dias (HFDw3) e foram submetidos ao desafio com LPS (SC-LPS; HFD-LPS; HFDw3-LPS). **A:** TNF- α (SC-LPS n=4; HFD-LPS, n=4; HFDw3-LPS n=5). **B:** CX3CL1 (SC-LPS n=4; HFD-LPS, n=4; HFDw3-LPS n=5) **C:** CXCL2 (SC-LPS n=4; HFD-LPS, n=4; HFDw3-LPS n=5). A quantidade de mRNA foi normalizada pelo endógeno ACTB. As barras representam a média do grupo e $\pm$ o desvio padrão da média. Para comparação, foi utilizado o teste one-way ANOVA.

6. CONCLUSÃO

A suplementação prévia com o ácido graxo ômega 3, em modelo de sepse, foi capaz de prevenir os danos causados pela dieta hiperlipídica tendo em vista o aumento do conteúdo proteico do receptor $\alpha 7$ nAChR e foi capaz de reduzir o risco de mortalidade associado ao desenvolvimento da sepse.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, C. L. et al. DNA methylation changes induced by a high-fat diet and fish oil supplementation in the skeletal muscle of mice. **Lifestyle Genomics**, v. 7, n. 4-6, p. 314-326, 2014. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/381777>>. Acesso em: 17 jul. 2020.
- ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J. Reflex principles of immunological homeostasis. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 313-335, 2012. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-020711-075015>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302009000500017&script=sci_arttext>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458-462, 2000. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35013070>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- CALDER, P. C. et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. S3, p. S1-S78, 2011. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/dietary-factors-and-lowgrade-inflammation-in-relation-to-overweight-and-obesity/D4F1B9B32B1DE434557332EB79972100>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- 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**, v. 36, n. 12, p. 1552, 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ijo2011275>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- CHACIŃSKA, M. et al. The Impact of OMEGA-3 Fatty acids supplementation on insulin resistance and content of adipocytokines and biologically active lipids in adipose tissue of high-fat diet fed rats. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 835, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/11/4/835>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- DE BOER, A. A. et al. Fish-oil-derived n-3 polyunsaturated fatty acids reduce NLRP3 inflammasome activity and obesity-related inflammatory cross-talk between adipocytes and CD11b+ macrophages. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 34, p. 61-72, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286316300547?casa_token=uhta1LS9jBcAAAAA:pNIsCRnPbqh0KuSQIFPxxBN62b1utt3i9FQ6jQr13zKF9vmFCahl2e6q7iXCBAAnV-Prk6SHe9oG_>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- DE SOUZA, C.T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/146/10/4192/2499721>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- DENG, D. et al. Systematic investigation on the turning point of over-inflammation to immunosuppression in CLP mice model and their characteristics. **International immunopharmacology**, v. 42, p. 49-58, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576916304520?casa_token=kCxX7TEOEQ4AAAAA:aX0pGobDU39rPNSKRgjrMLi5PxYEp6IDBno1Ui9-6UOd1VjSBEXVr3HXtqg2ZriZCW5UPKx1ZcMp>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- DING, S. et al. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. **PloS one**, v. 5, n. 8, p. e12191, 2010. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012191>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- FUCILE, S. The distribution of charged amino acid residues and the Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors: a predictive model. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, p. 155, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00155/full>>. Acesso em: 03 mar. 2020.

- GIASTAS, P. *et al.* Understanding structure–function relationships of the human neuronal acetylcholine receptor: insights from the first crystal structures of neuronal subunits. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 11, p. 1880-1891, 2018. Disponível em: <<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bph.13838>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- INNIS, S. M. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. **The Journal of pediatrics**, v. 143, n. 4, p. 1-8, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022347603003962>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- JU HWANG, C. *et al.* NF- κ B as a key mediator of brain inflammation in Alzheimer's disease. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 18, n. 1, p. 3-10, 2019. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnsnddt/2019/00000018/00000001/art00004#Supp>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- KALKMAN, H. O.; FEUERBACH, D. Modulatory effects of $\alpha 7$ nAChRs on the immune system and its relevance for CNS disorders. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, p. 2511-2530, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-016-2175-4>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- KIM, J. J.; SEARS, D. D. TLR4 and insulin resistance. **Gastroenterology research and practice**, v. 2010, 2010. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/grp/2010/212563/>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111-2117, 2011. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/57132?viewType=Print&viewClass=Print>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- MILANSKI, M. *et al.* Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 359-370, 2009. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/29/2/359.short>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- NAPIER, B. A. *et al.* Western diet regulates immune status and the response to LPS-driven sepsis independent of diet-associated microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 9, p. 3688-3694, 2019. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/116/9/3688.short>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- OH, D. Y. *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687-698, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410008883>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 219-246, 2010. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-021909-135846>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- O'MAHONEY, L. L. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids favourably modulate cardiometabolic biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis and meta-regression of randomized controlled trials. **Cardiovascular diabetology**, v. 17, n. 1, p. 98, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s12933-018-0740-x>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- PAVLOV, V. A. *et al.* Selective $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. **Critical care medicine**, v. 35, n. 4, p. 1139-1144, 2007. Disponível em: <https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2007/04000/High_mobility_group_box_1__HMGB1_.20.aspx>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 12, p. 743, 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrendo.2012.189.pdf?origin=ppub>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- PAYOLLA, T.B. *et al.* High-fat diet during pregnancy and lactation impairs the cholinergic anti-inflammatory pathway in the liver and white adipose tissue of mouse offspring. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 422, p.192-202, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720715301593>>. Acesso em: 03 mar. 2020.

- PITTET, D. *et al.* Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. **Intensive care medicine**, v. 21, n. 4, p. 302-309, 1995. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01705408>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- POLTORAK, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, 1998. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/282/5396/2085.abstract>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- PRADA, P. O. *et al.* Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1576-1587, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/146/3/1576/2501259>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- RITTIRSCH, D. *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 31, 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nprot.2008.214/>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- ROSS, R.; BRADSHAW, A. J. The future of obesity reduction: beyond weight loss. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 6, p. 319, 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrendo.2009.78>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- SOUZA, A. C. P. *et al.* Short-term high-fat diet consumption reduces hypothalamic expression of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit ($\alpha 7$ nAChR) and affects the anti-inflammatory response in a mouse model of sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 565, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00565/full>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- THALER, J.P. *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 1, p. 153-162, 2012. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/59660>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri2566>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- TREININ, M. *et al.* Role of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and RIC-3 in the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)**, v. 17, n. 2, p. 90-99, 2017. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnsamc/2017/00000017/00000002/art00003>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- VAN DE SANDE-LEE, S.; VELLOSO, L.A. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302012000600001&script=sci_arttext>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- WAISE, T.M.Z. *et al.* One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 464, n.4, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X15303272>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- WANG, X. *et al.* Activation of the cholinergic antiinflammatory pathway ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Endocrinology**, v. 152, n. 3, p. 836-846, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-abstract/152/3/836/2457359>>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- ZHANG, G.; GHOSH, S. Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. **Journal of endotoxin research**, v. 6, n. 6, p. 453-457, 2000. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/09680519000060060701>>. Acesso em: 01 jun. 2020.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Prevenção de danos inflamatórios no hipotálamo e em células da medula óssea pela suplementação com ácido graxo w3 em modelo de sepse: o papel do receptor colinérgico, registrada com o nº 4958-1/2018, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni e Isis De Cássia Alves Martins, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 12 de setembro de 2018.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	03/10/2018-01/07/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	03/10/2018-01/07/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	60
Idade/Peso:	08 semanas / 20g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas, FCA/UNICAMP

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

Campinas, 12 de setembro de 2018.


 Prof. Dr. Wagner José Fávoro
 Coordenador


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

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