

Investigação de marcadores inflamatórios em linfonodos mesentéricos de ratos durante o período pós-prandial

Lucas Xavier Martins de Oliveira

Jarlei Fiamoncini

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo

lsxmo@usp.br

Objetivos

O objetivo do estudo foi caracterizar a expressão gênica de marcadores inflamatórios em linfonodos mesentéricos isolados de ratos Sprague-Dawley desafiados com uma refeição hiperlipídica em diferentes tempos no período pós-prandial.

Métodos e Procedimentos

Cinquenta (50) Ratos Sprague-Dawley machos com 11 semanas de idade (~300 g), foram mantidos no biotério da FCF-USP nas condições ambientais padrão. Os animais foram aclimatados por uma semana antes do início dos experimentos. Na véspera do experimento, os animais foram submetidos a um jejum de 10 horas. No dia do experimento, os animais receberam, de forma espontânea, uma refeição hipercalórica composta por 1,02 g de sacarose, 1,47 g de lipídeos e 1,02 g de caseína, diluídos em 4 mL de água (exceto o grupo jejum). Após a refeição os animais foram eutanasiados nos tempos jejum, 60, 120, 180 e 300 minutos (10 animais por tempo). O sangue e os tecidos, incluindo os linfonodos mesentéricos foram coletados, armazenado a -80 °C e utilizado para análises subsequentes. Para a análise de expressão gênica, os linfonodos foram pulverizados em moinhos de esferas (sob baixas temperaturas) e ~50 mg do tecido foi pesado. A extração de RNA foi feita utilizando TRizol (Thermo Fischer, USA), e após isolado e quantificado, 1 µg de RNA foi

usado para a síntese de cDNA, utilizando um Kit para a transcrição reversa do RNA. Três genes foram investigados pela análise da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), sendo eles: Fator de transcrição κB (NF-κB, 5' - TTCAACATGGCAGACGACGA - 3'; 5' - TGGGGGCTTTGCTGTCATAG - 3'), *Toll Like Receptor 4* (TLR4, 5'-ATGCCTCTCTTGCATCTGGC-3'; 5'-GAAGTACCTCTATGCAGGGATTCA-3'), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1, 5'-TTAATGCCCACTCACCTGC-3'; 5'-GAGCTTGGTGACAAATACTACAGC-3'), e como gene de referência interno a proteína β2 microglobulina (B2M, 5'-TTCCACCCACCTCAGATAGAAAT-3', 5'-TGTGAGCCAGGATGTAGAAAGAC-3'). A quantificação dos resultados foi feita de acordo com o método de $\Delta\Delta CT$.

Resultados

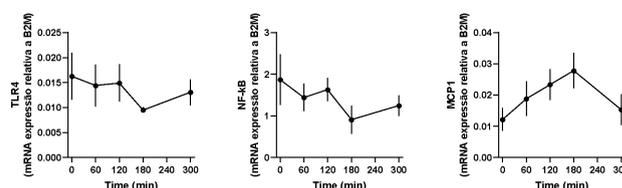


Figura 1. Expressão gênica de marcadores inflamatórios em linfonodos mesentéricos no período pós-prandial. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (n=6-8).

Embora o receptor TLR4, um importante componente da resposta imune inata responsável por identificar moléculas associadas a patógenos, tenha um papel central na resposta inflamatória, a expressão do gene que o codifica não apresentou variações significativas durante o período pós-prandial. Observou-se uma redução de aproximadamente 42% na expressão três horas após a ingestão da refeição, mas devido à variação nos dados, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Esse padrão também se aplica ao segundo alvo estudado, o fator de transcrição NF-κB, que é crucial na mediação da transcrição de citocinas, fatores de adesão e outros sinalizadores inflamatórios. Similarmente ao TLR4, a expressão de NF-κB apresentou uma redução na terceira hora (~50%), mas sem significância estatística. Por fim, foi observado um aumento de duas vezes na expressão de MCP1 também na terceira hora, sugerindo uma atividade inflamatória nos linfonodos.

Conclusões

Os linfonodos mesentéricos foram escolhidos por atuarem como centros de resposta imunológica para o trato gastrointestinal. Eles contêm uma rica rede de células imunes, incluindo linfócitos, macrófagos e células dendríticas, que desempenham um importante papel de filtragem e imunovigilância. No contexto pós-prandial, há um grande trânsito de nutrientes durante a absorção dos nutrientes, e é de interesse investigar de que modo esses sentinelas respondem a esses processos. Contudo há dificuldade em desassociar os linfonodos do tecido adiposo que o envolve, o que pode mascarar parte dos resultados observados. O processo de obtenção das amostras e as análises envolvidas foram partes importantes das atividades do estudo e que demandaram tempo. Para as próximas etapas espera-se poder aprofundar a investigação de marcadores inflamatórios, incluindo o uso de outras técnicas analíticas, que juntas podem fornecer informações mais completas sobre a

dinâmica dos alvos de interesse dentro do período pós-prandial. E ainda poder relacionar essas respostas com outros tecidos, fornecendo uma visão mais sistêmica.

Agradecimentos

FAPESP 2023/11351-0. PIBIC nº2023-849

Referências

- Meessen, E. C. E., Warmbrunn, M. v., Nieuwdorp, M., & Soeters, M. R. (2019). Human postprandial nutrient metabolism and low-grade inflammation: A narrative review. *Nutrients*, 11(12), 1–21. <https://doi.org/10.3390/nu11123000>
- Mikrani, R., Styles, I. K., Hoang, T. A., Abdallah, M., Senyschyn, D., Porter, C. J. H., Cao, E., & Trevaskis, N. L. (2022). Obesity-associated mesenteric lymph leakage impairs the trafficking of lipids, lipophilic drugs and antigens from the intestine to mesenteric lymph nodes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 180, 319–331. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.10.019>
- Singh, S., Anshita, D., & Ravichandiran, V. (2021). MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. In *International Immunopharmacology* (Vol. 101). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>