

# ÓLEO DE KRILL REDUZ A INFLAMAÇÃO INTESTINAL, MELHORANDO A INTEGRIDADE DO EPITÉLIO E REDUZINDO A PATOGENICIDADE DA *ESCHERICHIA COLI* ADERENTE-INVASIVA

Autores: Manuela Costanza, Vincenzo Cesi, Enrica Prete, Arma Negroni, Francesca Palone, Salvatore Cuchiarc, Salvatore Oliva, Beatrice Ieter, Laura Stronati. Revista: Digestive and Liver Disease – Vol. 48, pág. 34 – 42, 2016.

## RESUMO

Antecedentes: O óleo de krill é derivado de fonte marinha e rico em fosfolípidios, astaxantina e ácidos graxos ômega-3. Vários estudos descobriram seus benefícios contra danos oxidativos e inflamatórios.

## OBJETIVOS

Tivemos como objetivo avaliar a capacidade do óleo de krill para reduzir a inflamação intestinal, melhorando a integridade da barreira epitelial, aumentando a sobrevivência das células, e reduzindo a patogenicidade da *Escherichia coli* aderente-invasiva.

## MÉTODOS

Células Caco2 e HT29 foram expostas a cytomix (TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) para induzir a inflamação e expondo juntamente a cytomix e óleo de krill. Níveis de E-caderina, ZO-1 e F-actina foram analisados através de imunofluorescência para avaliar a integridade da barreira. Teste de raspagem foi realizado para medir a cicatrização de feridas. A sobrevivência celular foi analisada por citometria de fluxo. LF82 *Escherichia coli* aderente-invasiva foi usada para o ensaio de adesão/invasão.

## RESULTADOS

E-caderina e ZO-1 diminuíram nas células inflamadas, com perda de adesão célula-célula, e a polimerização de F-actina aumentou as fibras de stress. O óleo de krill restaurou as condições iniciais, melhorou a cicatrização de feridas, e reduziu a adesão/invasão bacteriana em células epiteliais e sobrevivência no interior dos macrófagos; além de reduzir a expressão do mRNA induzida por LF82 de citocinas pró-inflamatórias.

## CONCLUSÕES

O óleo de krill melhora a integridade da barreira intestinal e a restituição epitelial durante a inflamação, e controla a adesão e invasão bacteriana às células epiteliais. Assim, o óleo de krill pode representar uma ferramenta inovadora para reduzir a inflamação intestinal.

**PALAVRAS-CHAVE:** krill antártico; epitélio intestinal; bactérias luminais

## 1. INTRODUÇÃO

A homeostase intestinal é altamente regulada através de uma complexa interação entre a imunidade da mucosa, a integridade do epitélio, a microbiota intestinal e nutrientes. Estes últimos são cada vez mais conhecidos como uma variável que possui um papel crucial nesse processo, quer por interação direta com o epitélio quer alterando a composição da microbiota, ou na qualidade de alérgenos. Tanto a inflamação quanto o câncer podem resultar na desregulação dessa homeostase.

O ômega-3, ácidos graxos poli-insaturados n-3 (PUFAs), são denominados "ácidos graxos essenciais" e, normalmente, são obtidos a partir da dieta desde que não podem ser sintetizados por células humanas. Em particular, o  $\alpha$ -linolênico (ALA) é um n-3 PUFA que é endogenamente convertido em ácido eicosapentaenoico (EPA) e subsequentemente em ácido docosahexaenoico (DHA). As propriedades anti-inflamatórias dos ômega-3 PUFAs têm sido extensivamente estudadas quanto ao seu papel na prevenção e tratamento de muitas doenças inflamatórias humanas [1-4]. O consumo de frutos do mar fornece muitos benefícios para a saúde, muitos dos quais vêm da presença de uma quantidade adequada

de PUFAs, incluindo EPA e DHA, e antioxidantes [5,6]. A maioria dos estudos têm apoiado o valor de PUFAs derivados de óleo de peixe na inibição da inflamação e melhoria de doenças inflamatórias, como a asma, doenças alérgicas, doenças cardiovasculares e diabetes [7-10]. No intestino, o óleo de peixe tem provado ser fortemente protetor na inflamação intestinal em modelos animais [11-15], embora resultados controversos têm sido relatados na inflamação intestinal humana, especialmente na doença inflamatória do intestino (IBD) [2,7,16-18]. Curiosamente, foi apontado um papel importante do óleo de peixe na modulação da microbiota intestinal [19-22]. Mais recentemente, o óleo de krill (KO), um extrato preparado a partir de uma espécie de krill antártico, *Euphausia superba*, contendo ácidos graxos ômega-3, ácidos graxos derivados de fosfolipídios e o pigmento natural, astaxantina, surgiu supostamente por seus benefícios de saúde, incluindo a gestão e tratamento de distúrbios inflamatórios e metabólicos [5,23-28].

O KO é comparável ao óleo de peixe como fonte dietética de n-3 PUFAs, embora ele compreenda fosfolipídeos e triglicerídeos, enquanto que o óleo de peixe contém apenas triglicerídeos. Estudos pré-clínicos demonstraram que os ácidos graxos ligados a fosfolipídeos são absorvidos em órgãos específicos, tais como o coração, cérebro e fígado de animais, melhor do que quando ligado ao glicerol como os triglicerídeos [29]. Além disso, quando quantidades semelhantes de n-3 PUFAs são administradas, o KO parece ter uma maior eficácia na promoção do catabolismo lipídico [30], regulando negativamente a atividade

de vias envolvidas na produção de glicose hepática, bem como na síntese de lipídios e colesterol [31]. Recentemente, Ramprasath et al. observaram um aumento nas concentrações plasmáticas de EPA e DHA com o consumo de KO, em comparação com o óleo de peixe, e sugeriram ser devido a diferenças na absorção e biodisponibilidade com base na diferença estrutural dos dois óleos [32,33].

Os estudos das interações entre o hospedeiro e microbiota são fundamentais para a compreensão dos mecanismos envolvidos na homeostase intestinal e inflamação. Perturbações na estrutura de complexas comunidades comensais (referidas como disbiose) podem desencadear uma série de doenças mediadas pelo sistema imune, incluindo IBD [40,41].

Estudos recentes têm identificado uma prevalência de espécies bacterianas específicas em pacientes com doença de Crohn (CD), uma das duas formas de IBD, entre as quais está a *Escherichia coli* aderente-invasiva (AIEC) [42]. A AIEC é caracterizada por acrescida adesão e invasão epitelial, sobrevivência dentro de macrófagos, e formação de biofilmes [43]. Por essas razões, é pensado que essa espécie desempenhe um papel na patogênese da IBD [44].

Assim, no presente estudo, que teve como objetivo avaliar a capacidade de KO para regular a inflamação intestinal, induzindo a restituição funcional e morfológica epitelial, melhorando a sobrevivência das células e reduzindo a aderência e invasão de bactérias AIEC.



Krill antártico, *Euphausia superba*.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Óleo de krill

KO (Giellepi SPA, Milão, Itália), cuja composição específica são fosfolipídios (51%, w/w), DHA (7%, w/w), EPA (12%, w/w), ômega-3 (-3, ou PUFA-3) (21%, w/w), astaxantina (0,04%, w/w), foi utilizado a uma concentração de 250 mg/l em todos os experimentos (dose de 750 µg/poço). O fabricante forneceu um Certificado de Análise para o uso em suplementos nutricionais e alimentos funcionais, que inclui: total de ingredientes ativos, testes físicos, químicos e microbiológicos.

### 2.2. Óleo de milho

O óleo de milho (CO) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), cuja composição específica consiste na maior parte de ácido graxo (C18:1 20,0-42,2%; C18:2 39,4-62,0%), foi usado numa concentração de 250 mg/l (dose de 750 µg/poço) nas nossas experiências. O fabricante forneceu um Certificado de Análise para o uso em suplementos nutricionais e alimentos funcionais, incluindo ingredientes ativos, testes físicos, químicos, e microbiológicos.

### 2.3. Estirpe bacteriana LF82

A estirpe aderente, invasiva *E. coli*, LF82 (ileal estirpe de Crohn, gentilmente cedida pela professora Arlette Darfeuille-Michaud, Clermont Université, Université d'Auvergne, em Clermont-Ferrand, França) foi cultivada em placas de agar MacConkey por 24 horas à temperatura de 37 °C, e depois sub-cultivada em Luria Bertani Broth (LB, Oxoid, Basingstoke, UK) com incubação durante a noite à 150 rpm, 37 °C.

### 2.4. Linhagem celular

Células CACO2, HT29 (linhas celulares de câncer colorretal humano) e RAW 264.7 (macrófagos monócitos de camundongo com leucemia) foram obtidos a partir da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MA, EUA). CACO2 e HT29 foram cultivadas em confluência a 37 °C em meio mínimo essencial Dulbecco (DMEM, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e meio McCoy 5A (Gibco), respectivamente, suplementadas com 10% de soro fetal de vitelo inativado (FCS, Euroclone, Milão, Itália) e 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 Mg/ml de estreptomina (Biochrom, Berlim, Alemanha). RAW 264.7 foram culti-

vados em confluência a 37 °C em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementados com 10% FCS e 2 mM de L-glutamina.

### 2.5. Teste de raspagem

A cicatrização de feridas foi avaliada através do teste de raspagem, como previamente descrito [45]. Resumidamente, as células HT29 confluentes foram inoculadas sobre uma placa de 6-multi-poços a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/ml. A raspagem linear foi feita com uma ponta de pipeta estéril de 10 µl e as larguras de hiato (1 mm no dia 0) foram medidas após 24 horas. Em seguida, as células foram expostas a um cytomix de fator necrótico tumoral de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α de 10 ng/ml) e o interferon (IFN 250 ng/ml) para induzir a inflamação ou expor juntamente a cytomix e KO durante 24 horas. A cicatrização de feridas foi observada sob um microscópio Nikon invertido (Nikon, Tokyo, Japão) em 10 x de ampliação.

### 2.6. Citometria de fluxo

Células  $5 \times 10^5$  foram semeadas em placas de muitos poços (multiwell plates) com meio 5A de McCoy isento de soro. No dia seguinte, as células foram expostas ao cytomix ou coexpostas a cytomix e KO durante 18 horas. Em seguida, as células foram fixadas em etanol frio a 70% e mantidas durante a noite a +4 °C. As células centrifugadas foram suspensas novamente em 1 ml de tampão coloração propídio iodite/RNase (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As amostras foram incubadas durante 15 minutos a +4 °C e analisadas por citometria de fluxo (usando o FACSCalibur BD Biosciences). Para cada amostra, foram analisadas  $2 \times 10^4$  células. A distribuição do ciclo celular e conteúdo de DNA (hipodiploidia) foram calculados pelo software Cell Quest (BD Biosciences).

### 2.7. Imunofluorescência

As células expostas ao cytomix ou coexpostas a cytomix e KO foram cultivadas em confluência numa lâmina de microscópio de vidro durante 24 horas. Em seguida, as células foram fixadas durante 10 minutos em PBS com 4% paraformaldeído. As células foram lavadas em PBS, perme-

abilizadas por incubação durante 10 minutos em PBS com 0,1% de Triton X-100 (Sigma), e depois bloqueadas durante 30 minutos em PBS-1% BSA. Para a coloração de E-caderina e ZO-1 (Proteína de junção apertada 1), as amostras foram incubadas com anticorpos contra E-caderina (diluição de 1:100, BD Transduction Laboratories) e contra ZO-1 (diluição de 1:100, BD Transduction Laboratories) durante 1 hora e, em seguida, com o anticorpo secundário contra camundongo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) durante 30 minutos. Para a coloração de F-actina, as amostras foram incubadas com Alexa Fluor 488 conjugada com faloidina (diluição 1:50, Molecular Probes), de acordo com as instruções do fabricante. Em ambos os casos, 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) foi adicionado para contra coloração nuclear.

## 2.8. Testes de adesão e invasão bacteriana

**Ensaio de aderência:** As células foram cultivadas em placas de 24 poços para confluência e infectadas com estirpes LF82 a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1 para CACO2 e 100:1 para HT29, a 37 °C durante 3 horas. Para quantificar a aderência de LF82, as células infectadas foram lavadas duas vezes em PBS e lisadas durante 10 minutos com 0,5 ml de 0,1% de Triton X-100 em tampão PBS. Bactérias aderentes foram recuperadas e colocadas em placas de LB-agar. As últimas foram incubadas a 37 °C durante a noite e, em seguida, as colônias foram contadas para a análise estatística.

**Ensaio de invasão:** Para avaliar a capacidade de invasão de LF82, CACO2 e HT29 foram infectadas e incubadas, como acima. Após incubação as células foram lavadas duas vezes em PBS estéril e depois incubadas em DMEM com 100 µg/ml de gentamicina durante 1 hora para matar bactérias extracelulares. As células foram lavadas duas vezes em PBS estéril. A lise, a incubação e as contagens foram efetuadas tal como no ensaio de adesão. Para garantir a reprodutibilidade, precisão e significância estatística máxima, os ensaios de adesão e invasão foram realizados simultaneamente em triplicado.

## 2.9. Ensaios de sobrevivência bacteriana em macrófagos

Células RAW 264.7 foram pré-tratadas com KO durante 18 horas. As células foram infectadas a uma MOI de 100 bactérias (LF82) por macrófagos. Após 2 horas de incu-

bação a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>, os macrófagos infectados foram lavados duas vezes em PBS, e um meio de cultura fresca, contendo 100 µg/ml de gentamicina, foi adicionado para matar bactérias extracelulares. Após 1 hora, o meio foi removido e um meio fresco, contendo 20 µg/ml de gentamicina, foi adicionado para períodos mais longos após a infecção. Para determinar o número de bactérias internalizadas, as células foram lavadas em PBS e 0,5 mL de 1% de Triton X-100 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) de água deionizada foi colocado em cada poço durante 5 minutos para lisar as células eucarióticas. Triton X-100, na concentração usada não afetou a viabilidade bacteriana durante pelo menos 30 minutos. As amostras foram então removidas, diluídas e colocadas em placas de agar MacConkey para determinar o número de CFU recuperado a partir de monocamadas lisadas. O número de bactérias sobreviventes à gentamicina foi determinado após o tratamento antibiótico de 1, 4, e 18 horas.

## 2.10. Análise quantitativa de PCR

A expressão de TNF- $\alpha$  e IL-8 foi determinada por PCR quantitativa. Os iniciadores foram concebidos para seqüências não redundantes usando Primer Express v. 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A pureza do RNA foi avaliada pela razão de absorvência 260/280 e 260/230 nm (2.0 ou superior). A integridade do RNA foi verificada por análise em agarose com formaldeído. O RNA total (1 g) foi transcrito em reverso em DNAc por High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). A amplificação quantitativa PCR foi realizada pelo ABI Prism 7300 Sequence Detection System utilizando o kit de SYBR Green (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Sequências de iniciadores. TNF- $\alpha$ : forward 5'-TCTGGCCAGGCAGTCAGATC-3', reverso 5'-CAGTGATGTTGGGATAAAGAGC-3'; IL-8: forward 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3', reverso 5'-TCTCAGCCCTCTT-CAAAAATTCTC-3'. Níveis de transcrição relativos foram determinados utilizando-se actina como controlo do gene endógeno. Forward: 5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3' e reverso: 5'-GCCGATC-CACAC-3'.

## 2.11. Análise estatística

Todos os experimentos foram repetidos três vezes. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste t bicaudal Student ou teste do qui-quadrado (significância tomada como  $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Efeito de KO sobre a célula epitelial – adesão celular e arquitetura do tecido alterado por inflamação

Células confluentes CACO2 e HT29 foram expostas a um cytomix de citocinas pró-inflamatórias para induzir a inflamação ou coexpostas ao cytomix e KO durante 18 horas. A localização e expressão de E-caderina, ZO-1 e F-actina foram determinadas por imunofluorescência. Os resultados mostraram que a exposição ao cytomix causou uma diminuição da expressão de E-caderina e ZO-1 e uma perda celular - adesão celular e organização do tecido; no entanto, o tratamento com KO notavelmente restaurou as condições iniciais em ambas linhagens celulares e para ambas as proteínas (Fig. 1A-D). Além disso, a exposição ao cytomix causou um aumento acentuado do número de fibras de stress (SF) (principalmente evidente em células CACO2) com uma desorganização no conjunto juncional (principalmente aparente em células HT29). O tratamento conjunto com KO reduziu fortemente os números de SF e restaurou uma arquitetura do tecido apropriado (Fig. 1E, F).

#### 3.2. Efeito do KO sobre a restituição epitelial durante as condições fisiológicas e inflamatórias

As células confluentes HT29 foram raspadas em placas de Petri com uma ponta da micropipeta de 10 ml e as larguras dos vãos (1 mm no dia 0) foram medidos após 24 horas (dia 1: ocorreram 20% de cicatrização fisiológica). As células raspadas foram expostas ao cytomix para induzir a inflamação, ao KO sozinho, ou expostas conjuntamente ao cytomix e KO durante 24 horas. Em primeiro lugar, foi observado que as células expostas unicamente ao KO ficaram curadas muito mais rapidamente do que aquelas não expostas. Em segundo lugar, as células expostas ao cytomix mostraram um atraso de 13,41% de cura em um dia, em comparação com as células não expostas. No entanto, o tratamento conjunto com KO melhorou significativamente a taxa de restituição epitelial ( $p < 0,001$ ) (Fig. 2A, B).

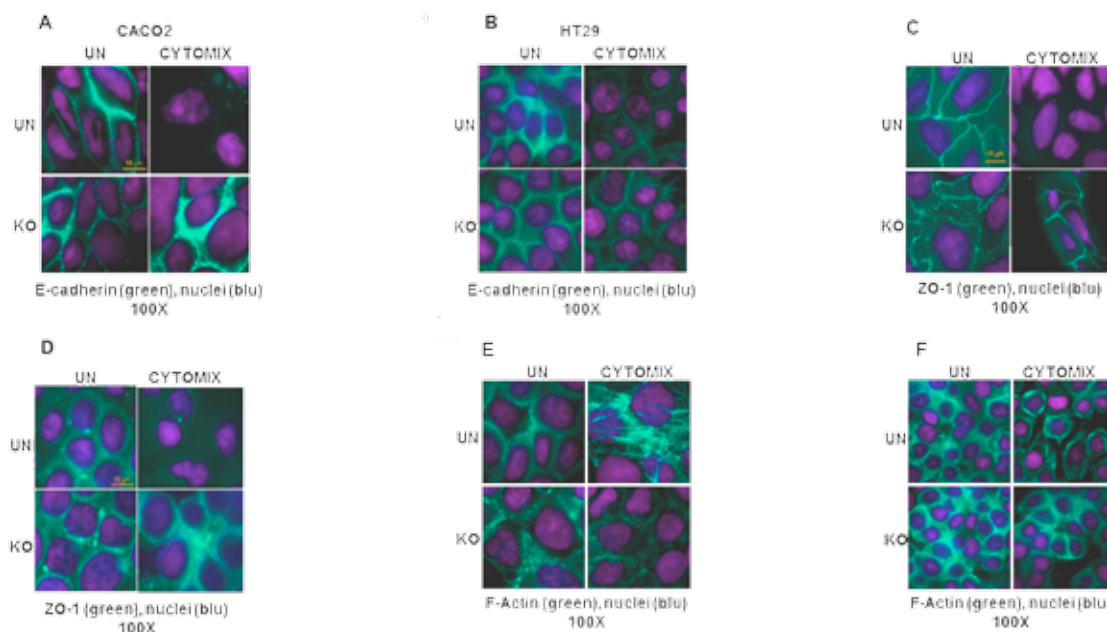


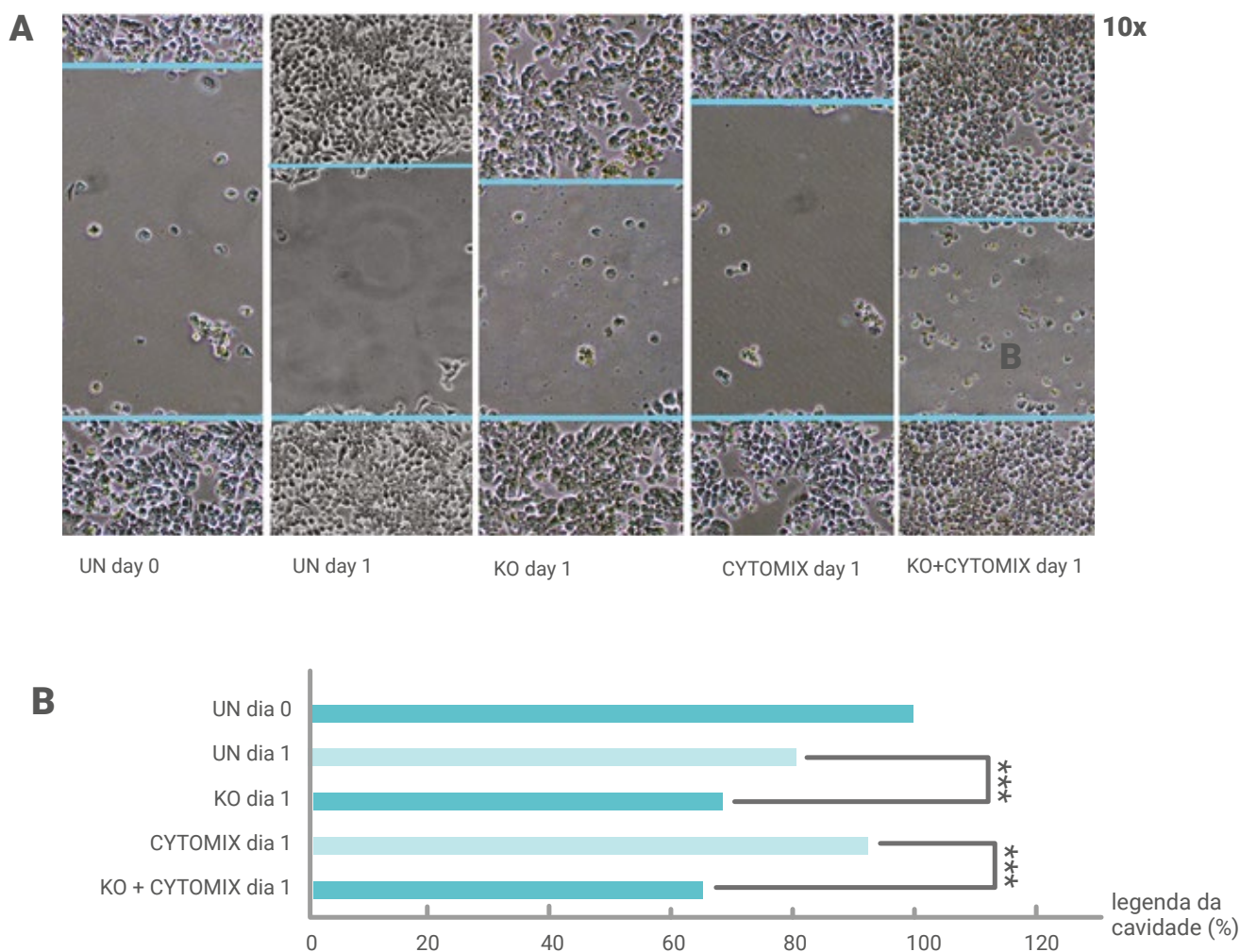
Fig 1. Exposição de células CACO2 e HT29 a cytomix causa significativa diminuição da expressão de E-cadherin (A,B) e ZO1(C,D). Além disso, a exposição ao cytomix causa uma redução da expressão de F-actina com um aumento acentuado no número SF (E) e uma desorganização na montagem de junção (F). O tratamento com óleo de krill sempre restabelece as condições iniciais. UN, células não tratadas; KO, óleo de krill.

### 3.3. Efeito de KO na morte celular induzida por inflamação

As células confluentes HT29 foram expostas ao cytomix para induzir à inflamação durante 6 horas ou previamente tratadas com KO durante 18 horas e, em seguida, expostas a cytomix durante 6 horas. No final dos tratamentos, a morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. A exposição ao cytomix aumentou significativamente a morte celular ( $p < 0,05$ ), no entanto, a coexposição ao KO diminuiu esse efeito ( $p < 0,05$ ), o que sugere que o KO possui uma importante função de sobrevivência celular (Fig. 3).

### 3.4. Efeito de KO sobre a expressão pró-inflamatória de citocina induzida por inflamação

As células confluentes CACO2 e HT29 foram expostas durante 6 horas ao cytomix ou pré-tratadas durante 18 horas com KO ou CO e, em seguida, expostas durante 6 horas ao cytomix. Os resultados mostraram que a exposição ao cytomix causou um aumento acentuado na indução de citocinas pró-inflamatórias, IL-8 e TNF- $\alpha$ , tal como avaliado por PCR em tempo real. Interessantemente, o pré-tratamento com KO reduziu significativamente a expressão de citocinas ( $p < 0,05$ ). Uma vez que o cytomix é um líquido à base de água, enquanto



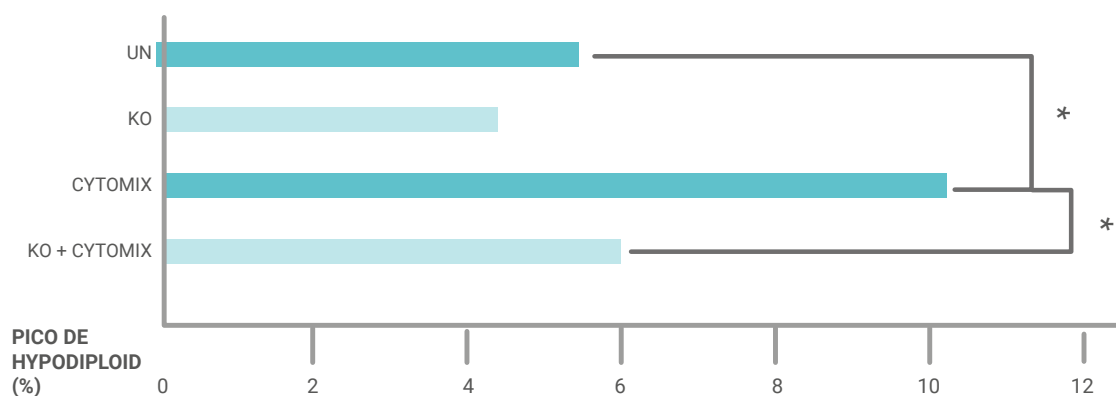
**Fig. 2.** Células HT29 expostas ao óleo de krill mostram mais rápida cicatrização do que aquelas não expostas (KO/dia1 vs. UN/dia1); células expostas a cytomix mostram um atraso de cura em comparação com células não expostas (CYTOMIX/dia1 vs. UN/dia1); células coexpostas a cytomix e óleo de krill melhoram significativamente a taxa de restituição epitelial (KO + CYTOMIX/dia1 vs. CYTOMIX/dia1). (A) cicatrização de raspagem observada no microscópio invertido a 10 x de ampliação; (B) largura do vão (%). As barras representam a média de três experimentos (70 medições de coluna)  $\pm$  DP. UN/dia0, o dia da raspagem; UN/dia1, 24 horas após a raspagem; KO, óleo de krill. \*\*\*  $p < 0,001$ .

KO é um líquido oleoso, a fim de eliminar os efeitos da substância oleosa sobre os resultados experimentais, utilizou-se um óleo vegetal, o CO como controlo adicional. Descobrimos que as células expostas apenas ao CO não alteraram a expressão da citocina; Do mesmo modo, as células expostas ao CO e cytomix não mostraram nenhuma diferença em comparação com as células expostas ao cytomix sozinho (Fig. 4A, B).

### 3.5. Efeito de KO na adesão e invasão de bactérias AIEC e sobrevivência dentro de macrófagos

Células CACO2 e HT29 confluentes foram infetadas com o LF82, o protótipo de estirpes AIEC. KO foi adicionado a culturas de células e testes de adesão e invasão foram realizados em comparação com cultu-

ras não tratadas com KO. Os resultados mostraram que KO foi capaz de diminuir significativamente a adesão ( $p < 0,05$ ), bem como a invasão ( $p < 0,01$ ) do LF82, sugerindo o seu papel num poderoso controle da estimulação imune bacteriana (Fig. 5A, B). Além disso, como as estirpes AIEC são conhecidas por sobreviver extensivamente dentro de macrófagos, foram medidas a absorção e sobrevivência bacteriana em linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7 pelo ensaio de proteção com gentamicina. Os resultados mostraram que LF82 pode sobreviver e replicar no interior dos macrófagos. No entanto, o tratamento com KO significativamente reduziu ( $p < 0,05$ ) a percentagem de bactérias que proliferaram após 18 horas (Fig. 5C).



**Fig. 3.** Exposição de células HT29 a cytomix aumenta significativamente a morte celular. O pré-tratamento com óleo de krill restabelece as condições iniciais. UN, células não tratadas; KO, óleo de krill. \*  $p < 0,05$ .

### 3.6. Efeito de KO sobre a expressão da pró-inflamatória citocina induzida por bactérias

Células confluentes CACO2 e HT29 foram expostas por 3 horas para LF82, sem ou após pré-tratamento durante 18 horas com KO. Os resultados mostraram que a exposição ao LF82 aumentou a indução de citocinas pró-inflamatórias, IL-8 e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ), tal como avaliado por PCR em tempo real; no entanto, o pré-tratamento com KO reduziu significativamente esse aumento (IL-8:  $P < 0,05$ , TNF- $\alpha$ :  $p < 0,01$ ). Curiosamente, KO por si só não afetou a expressão de citocinas (Fig. 6A, B).

## 4. DISCUSSÃO

O krill é uma rica fonte de proteínas de alta qualidade, bem como de EPA e DHA. Numerosos estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram que o KO é seguro

e bem tolerado, com nenhum relato de efeitos adversos [6,27,32,46-49]. Vários dados demonstraram os benefícios de saúde de KO contra danos oxidativos e inflamatórios [26,27]. Assim, no presente estudo, nossa intenção foi avaliar *in vitro* o potencial do KO para reduzir a inflamação, melhorar a restituição epitelial e proteger contra as bactérias luminais adesiva-invasiva. O epitélio intestinal proporciona uma barreira física com interligações entre as células epiteliais do intestino, que pode ser mimetizado *in vitro* com sucesso por uma monocamada confluenta epitelial, que expressam várias características morfológicas e funcionais dos enterócitos maduros [50]. O espaço entre essas células é selado por junções apertadas (TJs), que regulam a permeabilidade da barreira intestinal. TJs são compostas de proteínas transmembrana, que interagem com várias proteínas citoplasmáticas diferentes, tais como ZO-1, que liga

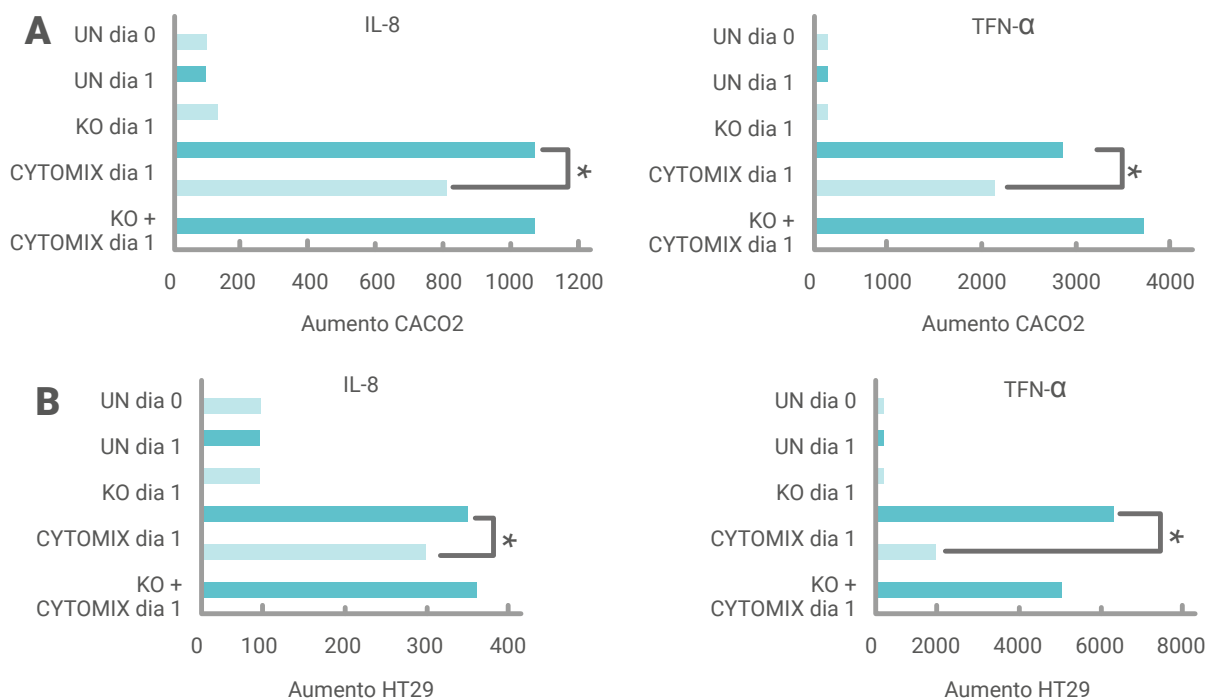


Fig. 4. Pré tratamento com óleo de krill mas não com óleo de milho, diminui significativamente a expressão citomix mRNA de citocinas pró-inflamatórias, IL-8 e TNF- $\alpha$ , em (A) CACO2 e (B) células HT29 em comparação as células não tratadas. As barras representam a média de 3 experimentos  $\pm$  DP. UN, células não tratadas; KO, óleo de krill; CO, óleo de milho. \* $p < 0.05$ .

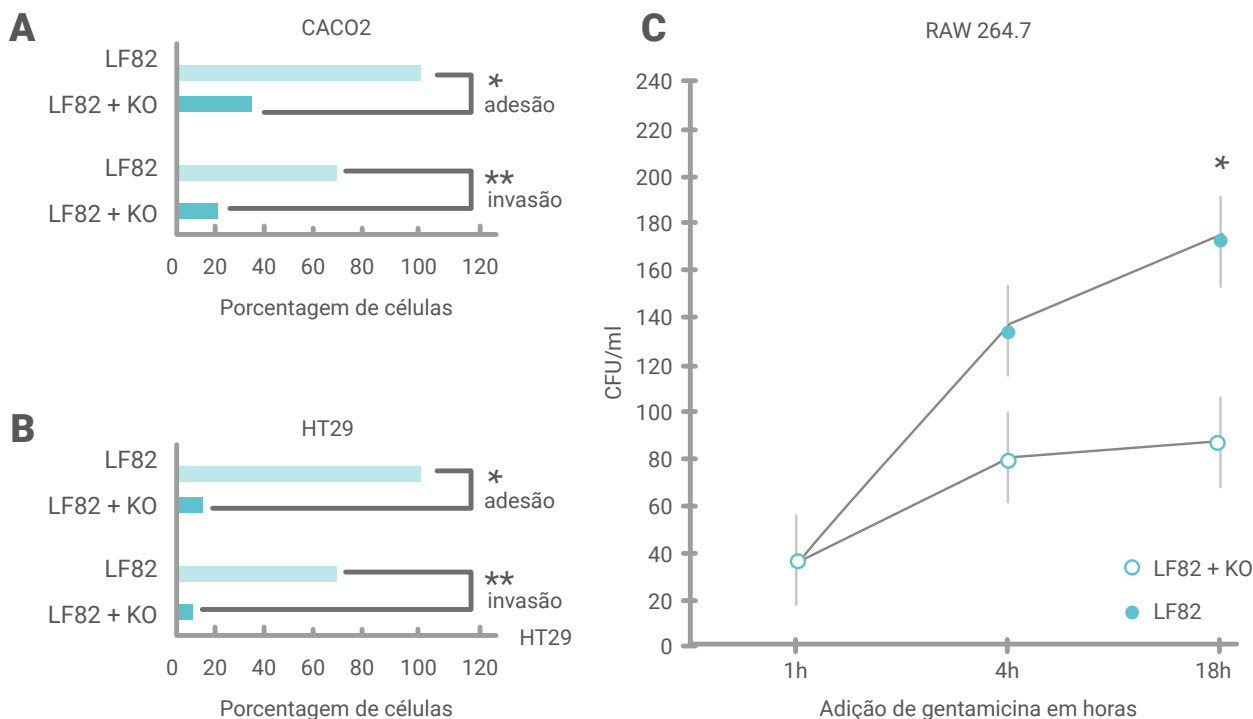


Fig. 5. Tratamento de óleo de krill prejudica significativamente a adesão (A) e invasão (B) em células CACO2 e HT29, bem como a sobrevivência dentro de macrófagos (C) em células RAW 264.7 da estirpe AIEC LF82. As barras representam a média de três experimentos  $\pm$  DP. AIEC, Escherichia coli aderente-invasiva; KO, óleo de krill. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .



TJs a filamentos F-actina do anel perijuncional apical da actinmiosina, assim regulando a permeabilidade paracelular [51].

Curiosamente, ZO-1 tem sido demonstrado por aumentar a colite induzida experimentalmente em camundongos, quando a dieta é suplementada com n-3 [52]. A montagem e permanente vedação de TJs depende crucialmente no contato de célula com célula. O complexo E-caderina-catenina desempenha um papel crucial na adesão célula-célula epitelial e na manutenção da arquitetura do tecido: perturbação na expressão ou função desse complexo resulta em perda de adesão intercelular [53]. Em conformidade, para avaliar o efeito de KO na permeabilidade intestinal, investigamos o nível de expressão de ZO-1 e E-caderina numa monocamada confluyente de HT29 e CACO2 que foram expostas a um cytomix de citocinas pró-inflamatórias para causar inflamação ou coexpostas ao cytomix e KO. Observou-se uma forte redução da expressão de ZO-1 e E-caderina, bem como uma perda resiliente de adesão célula-célula em células inflamadas que significativamente se recuperaram no tratamento com KO.

Além disso, a adesão celular é também estreitamente regulada pelo citoesqueleto da actina filamentosa (F-actina), cuja remodelação tem emergido como

um mecanismo chave subjacente da desmontagem juncional e ruptura da barreira epitelial em tecidos inflamados [54]. Filamentos de F-actina são conhecidos por ser organizados em fibras de stress (SF), feixes contrácteis que são alterados por estímulos estressores incluindo inflamação [55,56]. A acumulação de SF em células é comumente utilizada como um marcador de inflamação. Na nossa configuração experimental, foram expostas células ao cytomix e observou-se um aumento marcado de SF, bem como uma perda de adesão célula-célula. Células inflamadas tratadas com KO apresentaram uma redução significativa de SF e uma recuperação paralela do conjunto juncional.

Todos esses resultados sugerem fortemente que o KO é altamente eficaz em restaurar a integridade do epitélio e da permeabilidade intestinal.

Para reforçar os benefícios de KO na integridade estrutural da barreira epitelial, também investigamos sua influência na cicatrização da mucosa (MH). A base estrutural da MH é uma função de barreira intacta do epitélio intestinal que previne a translocação de bactérias comensais na mucosa com subsequente ativação de células imunitárias. A cicatrização da mucosa é uma nova meta emergente de terapia para inflamação

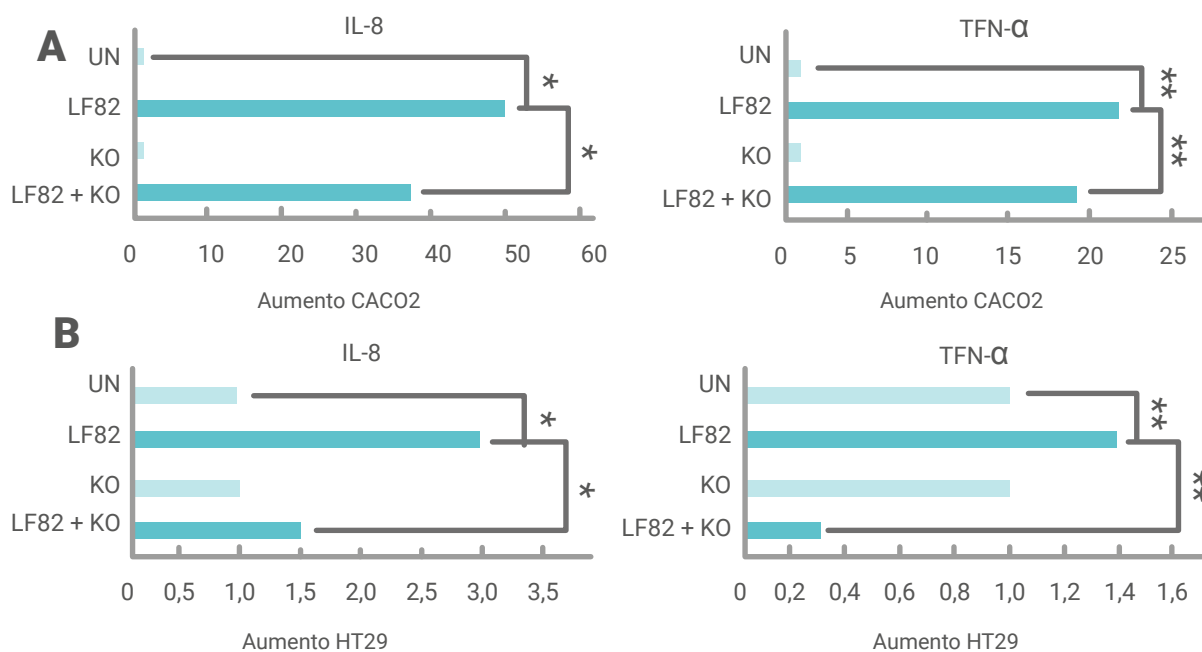


Fig. 6. Exposição de células CACO2 e HT29 para a estirpe LF82 provoca um aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias, IL-8 e TNF-α, em (A) células CACO2 e (B) HT29. Pré-tratamento com óleo de krill restabelece as condições iniciais. As barras representam a média de três experimentos ± DP. UN, células não tratadas; KO, óleo de krill. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01

intestinal e prevê remissão clínica a longo prazo e sobrevida livre de ressecção em IBD [57]. A base racional para assumir um efeito positivo de KO em MH reside na presença de n-3 PUFA e fosfolípidios, ambos conhecidos por seu papel na restituição epitelial [58,59]. Para avaliar a cicatrização da mucosa intestinal foi utilizado o teste de raspagem de ferida, que consiste na criação de uma "raspagem" em uma monocamada celular, capturando-se as imagens iniciais e em intervalos definidos, durante a migração celular seu fechamento (ou cura), e comparando as imagens para quantificar a restituição epitelial. Assim, as células raspadas foram expostas ao cytomix por si só para induzir à inflamação, ao KO por si só, ou expostas conjuntamente ao cytomix e KO. Curiosamente, os resultados mostraram que o KO melhora a reparação tecidual após a lesão produzida pela raspagem, aumentando a migração celular e reduzindo as larguras dos vãos. Essa capacidade é mantida quando o dano é piorado por inflamação, de fato, as células coexpostas ao KO foram capazes de curar muito mais rapidamente do que aquelas não expostas. Essas evidências enfatizam uma função principal de KO em melhorar a cicatrização do epitélio danificado.

Da mesma forma, KO também mostrou melhorar a sobrevivência de células epiteliais, reduzindo a morte celular durante a inflamação.

Para mostrar que os efeitos apresentados por KO não eram devido à sua natureza oleosa hidrofóbica, mas à sua riqueza em ômega-3, comparamos KO com outro óleo (óleo de milho) com composição de lipídios diferentes e sem ômega-3. Ao contrário de KO, o óleo de milho não foi capaz de neutralizar o efeito de cytomix em induzir as citocinas pró-inflamatórias, IL-8 e TNF- $\alpha$ .

Devido à associação estrita entre a perda da integridade da barreira e a proteção inadequada do epitélio intestinal contra as bactérias do intestino luminais aderentes-invasivas, queríamos explorar o valor de KO em reduzir o desencadeamento imune inadequado por AIEC, bactérias luminais com propriedades peculiares referenciais de adesão e invasão. No nosso estudo, infectamos as células com LF82, a estirpe de referência AIEC, e mostramos que a coexposição com KO significativamente reduziu a adesividade e a invasividade e, mais interessante, diminuiu significativamente a expressão

do mRNA induzida por AIEC de IL-8 e TNF- $\alpha$ . Além disso, o tratamento com KO reduziu significativamente a porcentagem de LF82 que sobreviveram no interior de macrófagos. Isso sugere que a influência de KO na estirpe AIEC é principalmente devido aos seus efeitos importantes sobre a morfologia da barreira epitelial, além de concebíveis efeitos diretos sobre essas bactérias.

## CONCLUSÃO

Todos estes resultados em conjunto proporcionam pela primeira vez forte evidência para apoiar o valor de KO na regulação da inflamação intestinal através da indução de restituição da propriedade funcional e morfológica epitelial, melhorando a sobrevivência de células e reduzindo a capacidade de adesão e invasão de bactérias AIEC. Considerando-se a total falta de efeitos adversos, acreditamos que o KO poderia abrir novas perspectivas para a sua possível utilização no tratamento de inflamação intestinal em humanos, especialmente para as formas de inflamação crônica, tais como IBD.

O trabalho futuro será focado no aprofundamento dos mecanismos de ação do KO e de suas funções como um novo suplemento anti-inflamatório em modelos animais com inflamação intestinal.

**Conflito de interesses:** Nenhum declarado.

**Financiamento:** Este trabalho foi apoiado pelo Grant MIUR art.11 D.M. 593/2000 N.10/12 do Ministério da Educação, Universidade e Pesquisa (MIUR).

## REFERÊNCIAS

- [1] Hofmanová J, Strakova N, Vaculová AH, et al. Interaction of dietary fatty acids with tumor necrosis factor family cytokines during colon inflammation and cancer. *Mediators of Inflammation* 2014;1–17.
- [2] Marion-Letellier R, Savoye G, Beck PL, et al. Polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel diseases: a reappraisal of effects and therapeutic approaches. *Inflammatory Bowel Diseases* 2013;19:650–61.
- [3] Proudman SM, Cleland LG, James MJ. Dietary omega-3 fats for treatment of inflammatory joint disease: efficacy and utility. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 2008;34:469–79.
- [4] Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* 2006;83:1505S–19S.
- [5] Barros MP, Poppe SC, Bondan EF. Neuroprotective properties of the marine carotenoid astaxanthin and omega-3 fatty acids, and perspectives for the natural combination of both in krill oil. *Nutrients* 2014;6:1293–317.
- [6] Tur JA, Bibiloni MM, Sureda A, et al. Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. *British Journal of Nutrition* 2012;107(Suppl. 2):S23–52.
- [7] Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015;1851:469–84.
- [8] Miyata J, Arita M. Role of omega-3 fatty acids and their metabolites in asthma and allergic diseases. *Allergology International* 2015;64:27–34.
- [9] Widmer RJ, Flammer AJ, Lerman LO, et al. The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease. *American Journal of Medicine* 2014;128:229–38.
- [10] Guadarrama - LópezAL, Valdés - RamosR, Martínez-Carrillo BE. Type 2 diabetes, PUFAs, and vitamin D: their relation to inflammation. *Journal of Immunology Research* 2014;860703.
- [11] Li Y, Wang X, Lin, et al. The study of n-3 PUFAs protecting the intestinal barrier in rat HS/R model. *Lipids in Health and Disease* 2014;13:146.
- [12] Hokari R, Matsunaga H, Miura S. Effect of dietary fat on intestinal inflammatory diseases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2013;28(Suppl. 4):33–6.
- [13] Garib R, Garla P, Torrinas RS, et al. Effects of parenteral fish oil lipid emulsions on colon morphology and cytokine expression after experimental colitis. *Nutricion Hospitalaria* 2013;28:849–56.
- [14] Liu Y, Chen F, Odle J, et al. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. *Journal of Nutrition* 2012;142:2017–24.
- [15] Kono H, Fujii H, Ogiku M, et al. Enteral diets enriched with medium-chain triglycerides and n-3 fatty acids prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Translational Research* 2010;156:282–91.
- [16] Farrukh A, Mayberry JF. Is there a role for fish oil in inflammatory bowel disease. *World Journal of Clinical Cases* 2014;2:250–2.
- [17] Cabré E, Mañosa M, Gassull MA. Omega-3 fatty acids and inflammatory bowel diseases – a systematic review. *British Journal of Nutrition* 2012;107(Suppl. 2):S240–52.
- [18] Turner D, Shah PS, Steinhart AH, et al. Maintenance of remission in inflammatory bowel disease using omega-3 fatty acids (fish oil): a systematic review and meta-analysis. *Inflammatory Bowel Diseases* 2011;17:336–45.
- [19] Patterson E, O’Doherty RM, Murphy EF, et al. Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. *British Journal of Nutrition* 2014;20:1–13.
- [20] Yu HN, Zhu J, Pan WS, et al. Effects of fish oil with a high content of n-3 polyunsaturated fatty acids on mouse gut microbiota. *Archives of Medical Research* 2014;45:195–202.
- [21] Xie P, Wang Y, Wang C, et al. Effect of different fat sources in parental diets on growth performance, villus morphology, digestive enzymes and colorectal microbiota in pigeon squabs. *Archives of Animal Nutrition* 2013;67:147–60.
- [22] Ghosh S, DeCoffe D, Brown K, et al. Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis. *PLoS ONE* 2013;8(2):e55468.
- [23] Kwantes JM, Grundmann O. A brief review of krill oil history, research, and the commercial market. *Journal of Dietary Supplements* 2014;12:23–35.
- [24] Fasano E, Serini S, Mondella N, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of selected natural compounds contained in a dietary supplement on two human immortalized keratinocyte lines. *BioMed Research International* 2014;327452.
- [25] Berge K, Piscitelli F, Hoem N, et al. Chronic treatment with krill powder reduces plasma triglyceride and anandamide levels in mildly obese men. *Lipids in Health and Disease* 2013;12:78.
- [26] Grimstad T, Bjørndal B, Cacabelos D, et al. Dietary supplementation of krill oil attenuates inflammation and oxidative stress in experimental ulcerative colitis in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2012;47:49–58.
- [27] Ferramosca A, Conte A, Burri L, et al. A krill oil supplemented diet suppresses hepatic steatosis in high-fat fed rats. *PLoS ONE* 2012;7:e38797.
- [28] Deutsch L. Evaluation of the effect of Neptune Krill Oil on chronic inflammation and arthritic symptoms. *Journal of the American College of Nutrition* 2007;26:39–48.
- [29] Wijendran V, Huang MC, Diau GY, et al. Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates. *Pediatric Research* 2002;51:265–72.
- [30] Vigerust NF, Bjørndal B, Bohov P, et al. Krill oil versus fish oil in modulation of inflammation and lipid metabolism in mice transgenic for TNF- $\alpha$ . *European Journal of Nutrition* 2013;52:1315–25.
- [31] Burri L, Berge K, Wibrand K, et al. Differential effects of krill oil and fish oil on the hepatic transcriptome in mice. *Frontiers in Genetics* 2011; 2:45.
- [32] Ramprasath VR, Eyal I, Zchut S, et al. Enhanced increase of  $\omega$ -3 index in healthy individuals with response to 4-week n-3 fatty acid supplementation from krill oil versus fish oil. *Lipids in Health and Disease* 2013;5:12–78.
- [33] Ramprasath VR, Eyal I, Zchut S, et al. Response to commentary on a trial comparing krill oil versus fish oil. *Lipids in Health and Disease* 2014; 13:17–8.
- [34] Bolin AP, Macedo RC, Marin DP, et al. Astaxanthin prevents in vitro auto-oxidative injury in human lymphocytes. *Cell Biology and Toxicology* 2010;26:457–67.
- [35] Macedo RC, Bolin AP, Marin DP, et al. Astaxanthin addition improves human neutrophils function: in vitro study. *European Journal of Nutrition* 2010;49:447–57.
- [36] Otton R, Marin DP, Bolin AP, et al. Astaxanthin ameliorates the redox imbalance in lymphocytes of experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* 2010;186:306–15.
- [37] Hussein G, Nakagawa T, Goto H, et al. Astaxanthin ameliorates features of metabolic syndrome in SRH/NDmcr-cp. *Life Sciences* 2007;80:522–9.
- [38] Hussein G, Sankawa U, Goto H, et al. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products* 2006;69:443–9.
- [39] Guerin M, Huntley ME, Olaizola M.

Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology* 2003;21:210–6.

[40] McLean MH, Dieguez Jr D, Miller LM, et al. Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Gut* 2015;64:332–41.

[41] Huttenhower C, Kostic AD, Xavier RJ. Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity* 2014;40:843–54.

[42] Rolhion N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2007;13:1277–83.

[43] Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *International Journal of Medical Microbiology* 2002;292:185–93.

[44] Martinez-Medina M, Garcia-Gil LJ. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: an update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 2014;5:213–27.

[45] Ciacci C, Lind SE, Podolsky DK. Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* 1993;105:93–101.

[46] Maki KC, Reeves MS, Farmer M, et al. Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women. *Nutrition Research* 2009;29:609–15.

[47] Deutsch L. Evaluation of the effect of Neptune krill oil on chronic inflammation and arthritic symptoms. *Journal of the American College of Nutrition* 2007;26:39–48.

[48] Bunea R, El Farrah K, Deutsch L. Evaluation of the effects of Neptune krill oil on the clinical course of hyperlipidemia. *Alternative Medicine Review* 2004;9:420–8.

[49] Sampalis F, Bunea R, Pelland MF, et al. Evaluation of the effects of Neptune krill oil on the management of premenstrual syndrome and dysmenorrhea. *Alternative Medicine Review* 2003;8:171–9.

[50] Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology* 2005;21:1–26.

[51] Le Dréan G, Haure-Mirande V, Ferrier L, et al. Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK dependent pathway. *FASEB Journal* 2014;28:1059–70.

[52] Whiting CV, Bland PW, Tarlton JF. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids reduce disease and colonic proinflammatory cytokines in a mouse model of colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* 2005;11:340–9.

[53] Oldenburg J, de Rooij J. Mechanical control of the endothelial barrier. *Cell and Tissue Research* 2014;355:545–55.

[54] Ivanov AI, Parkos CA, Nusrat A. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *American Journal of Pathology* 2010;177:512–24.

[55] Bogatcheva NV, Verin AD. The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function. *Microvascular Research* 2008;76:202–7.

[55] Bogatcheva NV, Verin AD. The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function. *Microvascular Research* 2008;76:202–7.

[56] Houle F, Huot J. Dysregulation of the endothelial cellular response to oxidative stress in cancer. *Molecular Carcinogenesis* 2006;45:362–7.

[57] Neurath MF, Travis SP. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut* 2012;61:1619–35.

[58] Sturm AI, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 2008;14:348–53.

[59] Lacy ER. Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Gastroenterology* 1988;10(Suppl. 1):S72–7.