



AVALIAÇÃO DO PAPEL DO PALMITATO NA MODULAÇÃO DE AUTOFAGIA HIPOTALÂMICA EM ANIMAIS SUBMETIDOS À CIRURGIA DE ESTEREOTAXIA E AO TRATAMENTO *EX VIVO*.

Beatriz Piatezzi Siqueira*, Andressa Reginato, Josiane Miyamoto, Marciane Milanski.

Laboratório de Distúrbios do Metabolismo, Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

Resumo:

O acúmulo metabólico de ácidos graxos promove a lipotoxicidade, nociva para a região hipotalâmica. O aumento nos níveis circulantes de palmitato no hipotálamo pode atuar em diversas vias, como por exemplo, o metabolismo das ceramidas que por sua vez podem contribuir para inflamação e resistência à insulina. O uso da miriocina, droga inibitória da síntese de *de novo* ceramida parece atenuar os efeitos nocivos provocados pelas ceramidas. A autofagia é um sistema de degradação lisossomal que contribui para a homeostasia celular, degradando proteínas agregadas, organelas senescentes, por exemplo. Alterações no processo autofágico parecem interferir no controle da homeostasia energética executada pelo hipotálamo, contribuindo para a progressão da obesidade. Diante o exposto, o objetivo do projeto foi avaliar o papel do palmitato e a inibição da síntese de ceramidas na autofagia hipotalâmica. Para tanto, utilizamos um modelo experimental para a cirurgia estereotáxica e posterior tratamento intracerebroventricular (icv) agudo com palmitato e miriocina. Os resultados mostraram que o tratamento icv com o palmitato foi capaz de reduzir a ingestão alimentar dos animais, ativar citocinas inflamatórias no hipotálamo e aumentar o conteúdo de LAMP1 e Rab7, marcadores relacionados a fusão do autofagossomo com o lisossomo. No entanto, a miriocina parece atenuar os efeitos do palmitato, revertendo o efeito inflamatório e a indução de marcadores autofágicos. Como conclusão acreditamos que a miriocina seja capaz de restaurar os efeitos do palmitato na modulação de genes autofágicos envolvidos na indução de autofagia, portanto, indicando que o metabolismo de ceramidas pode influenciar na modulação de autofagia celular em nosso modelo.

Palavras-chave:

Autofagia, Palmitato, Miriocina.

Introdução

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo corporal considerada, nos últimos anos, um grave problema de saúde pública¹. O balanço energético positivo resultante da ingestão de alimentos de alta densidade calórica aliados à redução do gasto energético em decorrência do menor esforço físico nas atividades cotidianas, contribuem para o surgimento e progressão da obesidade². Esse controle da homeostasia energética é realizado principalmente pelo hipotálamo. Porém, em decorrência da alta ingestão de ácidos graxos saturados, especialmente os de cadeia longa, os indivíduos obesos apresentam importantes alterações no controle hipotalâmico da homeostasia energética³. Em conjunto ao quadro de obesidade, o tecido adiposo chega ao seu limite máximo, e os ácidos graxos são conduzidos para tecidos ectópicos, sofrendo uma série de reações oxidativas. Este quadro nocivo denomina-se lipotoxicidade^{4,5}. A área hipotalâmica pode ser prejudicada por este evento e, ácidos graxos saturados, como o palmitato (PA) são capazes de atingir a região central⁵. No hipotálamo, o PA induz uma cascata de sinalização das vias inflamatórias, provoca resistência neuronal à hormônios periféricos, interage com receptores da imunidade inata e atua no metabolismo de esfingolipídios^{6,7,8,9}. Da classe dos esfingolipídios, existem as ceramidas, classificadas como um grupo de lipídios bioativos¹⁰. Acredita-se também que o metabolismo de ceramidas bem como ativação de vias inflamatórias possam estar envolvidos na desregulação de diversas vias de sinalização intracelular^{11,12}. Dados em literatura mostram que o uso da miriocina, droga inibitória da síntese de *de novo* ceramidas que acontece através do bloqueio da ação enzimática da Serina Palmitoil Transferase (SPT), enzima catalisadora da transformação de ceramidas através da molécula de palmitoil-CoA, foi suficiente para atenuar a sinalização inflamatória, melhorar parâmetros bioquímicos, além de estimular a perda de peso independente da ingestão energética em roedores¹³. A autofagia é um sistema de degradação lisossomal que contribui para a homeostasia celular, removendo proteínas agregadas, organelas senescentes, por exemplo e está envolvida as alterações hipotalâmicas nos modelos de obesidade^{14,15}. Alterações no processo autofágico parecem interferir no controle da homeostasia energética executada pelo hipotálamo¹⁶.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar o papel do palmitato e a inibição da síntese de ceramidas na autofagia hipotalâmica.

Métodos

Os animais foram submetidos à canulação de ventrículo lateral através de cirurgia estereotáxica. Após o período de recuperação do implante, foram utilizados em procedimentos experimentais com tratamento via intracerebroventricular (icv) com palmitato e/ou miriocina. Os animais foram tratados de 7-9 dias, divididos nos seguintes grupos: controle (CT); controle miriocina (CT + MIR); palmitato controle (PA) (180 μ M) e palmitato + miriocina (PA MIR) (300 nM). Todos receberam 2 μ L/cada reagente.

Resultados e Discussão

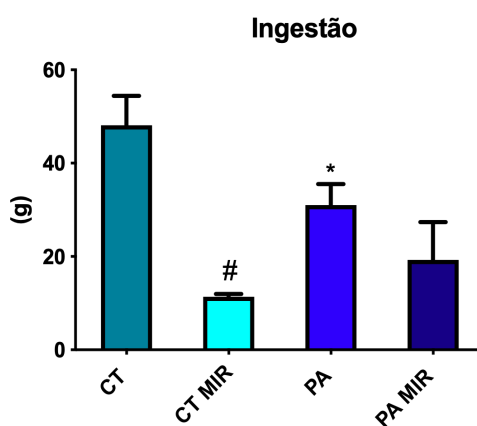


Figura 1. Ingestão alimentar (g) de camundongos tratados com veículo; veículo (CT) + miriocina (CT MIR); palmitato (PA) (180 μ M); palmitato + miriocina (PA MIR) (300 nM) durante 7-9 dias. Os valores são mostrados como média e erro padrão da média. * $P \leq 0,05$. $n = 4 - 6$ animais/grupo.

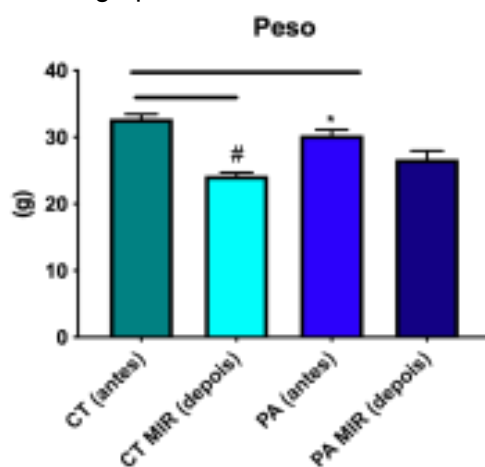


Figura 2. Ganho de peso (g) em camundongos tratados com veículo (CT); veículo + miriocina (CT+MIR); palmitato (PA) (180 μ M); palmitato + miriocina (PA+MIR) (300 nM) durante 7-9 dias. Os valores são mostrados como média e erro padrão da média. * $P \leq 0,05$. $n = 4 - 6$ animais/grupo.

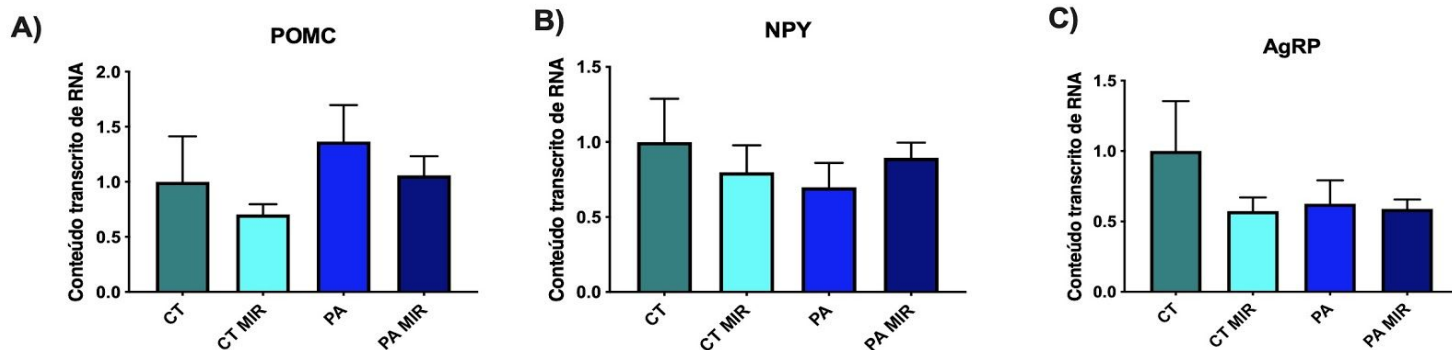


Figura 3. Expressão do conteúdo transcrito de RNA de POMC, NPY e AgRP respectivamente, por RT-qPCR no hipotálamo de camundongos tratados com veículo (CT); veículo + miriocina (CT MIR); palmitato (PA) (180 μ M); palmitato + miriocina (PA MIR) (300 nM) durante 7-9 dias. * $P \leq 0,05$. $n = 4 - 6$ animais/grupo.

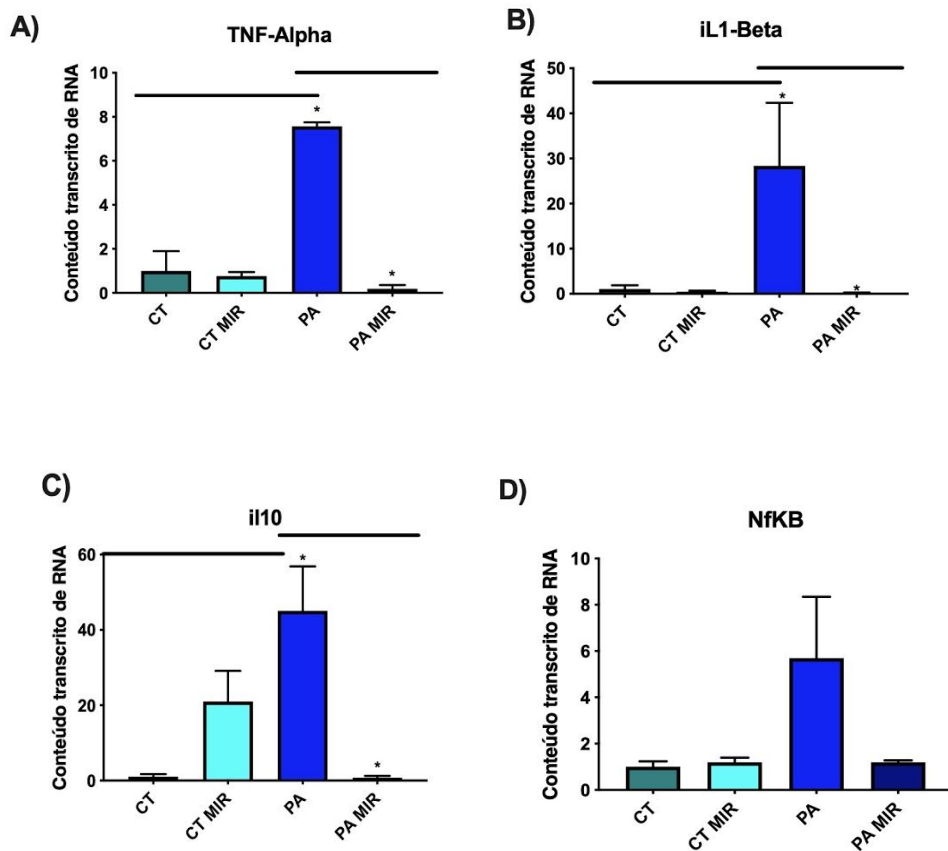


Figura 4. Expressão do conteúdo transcrito de RNA de TNF- α , IL-1 β , IL-10, NF- κ B respectivamente, por RT-qPCR no hipotálamo de camundongos tratados com veículo (CT); veículo + miriocina (CT MIR); palmitato (PA) (180 μ M); palmitato + miriocina (PA MIR) (300 nM) durante 7-9 dias. *P \leq 0,05. n = 4 - 6 animais/grupo.

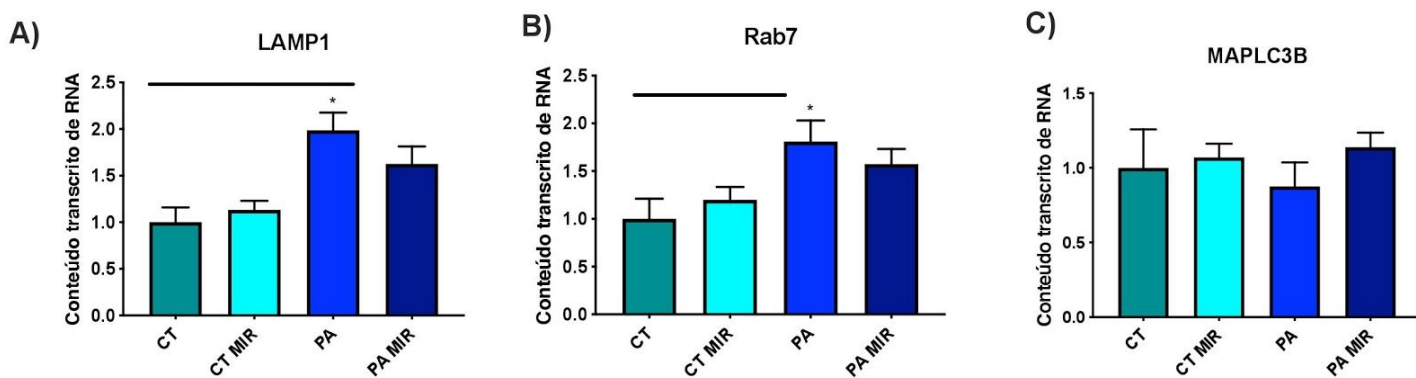


Figura 5. Expressão do conteúdo transcrito de RNA de LAMP-1, Rab7 e MAPLC3 respectivamente, por RT-qPCR no hipotálamo de camundongos tratados com veículo (CT); veículo + miriocina (CT MIR); palmitato (PA) (180 μ M); palmitato + miriocina (PA MIR) (300 nM) durante 7-9 dias. *P \leq 0,05. n = 4 - 6 animais/grupo.

O tratamento com palmitato (PA) foi capaz de diminuir a ingestão alimentar quando comparado ao seu controle (CT). E, como consequência da ingestão alimentar, o palmitato (PA) assim como a miriocina (CT MIR) foram capazes de reduzir a massa corporal após o período de tratamento comparado ao valor de massa corpórea basal. Em relação ao conteúdo transcrito de marcadores inflamatórios, encontramos que o uso da miriocina, inibidor da síntese de ceramidas, foi capaz de reverter o papel pró-inflamatório do ácido graxo palmitato, reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias no hipotálamo, como TNF- α , IL-1 β e a expressão de NF- κ B. Ademais, quanto à maquinaria autofágica, o PA é capaz de aumentar o conteúdo de LAMP1 e Rab7, marcadores relacionados a fusão do autofagossomo com o lisossomo. Interessante, o tratamento com PA combinado ao uso de miriocina (PA MIR) foi capaz de atenuar a indução na expressão desses genes. Em conjunto, nossos resultados mostram que o tratamento com miriocina parece ser eficaz para a redução de marcadores pró-inflamatórios e parece influenciar na modulação de genes da maquinaria autofágica. Ademais, o palmitato parece modular a autofagia hipotalâmica, aumentando-a.

Conclusão

Conclui-se que palmitato parece induzir ao aumento na autofagia hipotalâmica. Em contrapartida, o tratamento com miriocina parece ser eficaz para a redução de marcadores pró-inflamatórios e parece influenciar na modulação de genes da maquinaria autofágica. No entanto, por influenciar na ingestão alimentar mesmo em animais controle, acreditamos que seja necessário investigar novas doses e tempos de tratamento de miriocina para a confirmação dos nossos achados referentes à modulação de autofagia.

Agradecimentos



Referências

- 1 ROSINI, T. C. et al. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 58, n. 3, p. 383-387, Jun. 2012.
- 2 SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, supl. 1, p. S29-S36, 2003.
- 3 VAN DE SANDE-LEE, S.; VELLOSO, L. A. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 56, n. 6, p. 341-350, ago. 2012.
- 4 SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094-2101, 1 jun. 2011.
- 5 MORENTIN, P. B. M. et al. Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 350-361, mar. 2010.
- 6 DALVI, P. et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF- α on appetite-regulating NPY neurons. **International Journal of Obesity**, v. 41, p. 149-158, jan. 2017.
- 7 BENOIT, S. C. et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, p. 2577-2589, 1 set. 2009.
- 8 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**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.359-370, 14 jan. 2009.
- 9 CRUCIANI-GUGLIELMACCI, C. et al. Brain Ceramide Metabolism in the Control of Energy Balance. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 787, 12 out. 2017.
- 10 HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids: lessons from sphingolipids. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 139-150, fev. 2008.
- 11 CHAURASIA, B.; SUMMERS, S. A. Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 10, p. 538-550, out. 2015.
- 12 BIKMAN, B. T.; SUMMERS, S. A. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 121, n. 11, p. 4222-4230, 1 nov. 2011.
- 13 YANG, G. et al. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. **American Journal Of Physiology-endocrinology And Metabolism**, v. 297, n. 1, p. 211-224, jul. 2009.
- 14 VALDOR, R.; MACIAN, F. Autophagy and the regulation of the immune response. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 66, n. 6, p.475-83, 2012.
- 15 SOUZA, L. M. I. **Sistema ubiquitina-proteassoma no hipotálamo: implicações para a gênese da obesidade**. 2013. 99 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP.
- 16 PORTOVEDO, M. et al. Saturated Fatty Acids Modulate Autophagy's Proteins in the Hypothalamus. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 0119850, 18 mar. 2015.