



## **EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE COCO NA VIA DE SINALIZAÇÃO DA LEPTINA NO HIPOTÁLAMO DE CAMUNDONGOS SWISS SAUDÁVEIS**

**Palavras-Chave:** Óleo de Coco, Leptina, Hipotálamo

**Autores/as:**

**ANA BEATRIZ PROFIRO LOPES [FCA-UNICAMP]**

**LARISSA DA SILVA BRUZASCO [FCA-UNICAMP]**

**ALANA CAROLINA COSTA VERAS (coorientadora)[FCA-UNICAMP]**

**Prof. Dr. MARCIO ALBERTO TORSONI (orientador) [FCA-UNICAMP]**

---

### **INTRODUÇÃO:**

A obesidade está associada a um estado de inflamação crônica de baixo grau, caracterizada pela expressão de marcadores pró-inflamatórios nos tecidos metabólicos e na circulação (PURKAYASTHA e CAI, 2013). Estudos em animais com obesidade induzida pela dieta mostraram que tanto a inflamação periférica quanto o aumento da sinalização inflamatória no hipotálamo estão relacionados ao desenvolvimento de resistência central à leptina (WANG et al, 2012; THALER et al, 2012). A resistência a leptina, por sua vez, pode estar vinculada a uma falha no transporte da leptina ou a déficits nos mecanismos de sinalização intracelular a jusante da leptina (YAZDI et al, 2015).

A leptina é um hormônio circulante, secretado por adipócitos, que desempenha papel regulador da homeostase energética (ZHOU e RUIL, 2013). Os receptores de leptina são expressos em todo o corpo, incluindo o sistema nervoso central, onde a leptina atua para regular a função neuroendócrina, o comportamento alimentar e o gasto energético (KELESIDIS, 2010). A ação biológica da leptina é mediada pela forma longa do receptor de leptina (LEPRb), que é expressa em muitas áreas do cérebro, incluindo o hipotálamo (ZHOU e RUIL, 2013). A ligação da leptina ao LEPRb ativa a JAK2, iniciando várias vias de transdução de sinal que agem para regular o balanço energético e o peso corporal. A transdução da sinalização de leptina é marcada pelo aumento da fosforilação do STAT3 (VELLOSO e SCHWARTZ, 2011), um fator crítico de transcrição para as ações antiobesidade da leptina (MORRIS e RUI, 2009).

Ainda, o hipotálamo contém vários subnúcleos, dos quais o núcleo arqueado é um importante local de ação da leptina, já que esse hormônio tanto inibe os neuropeptídios NPY e AgRP que são orexigênicos e aumentam a ingestão alimentar, bem como estimula POMC, que por sua vez ativa fatores anorexigênicos, como  $\alpha$ MSH que inibem a ingestão alimentar (CONE, 2005). Além disso,

pesquisas relataram que a ingestão alimentar de ácidos graxos pode afetar e regular a atividade gênica nos tecidos adiposos (VAN DIJK, 2009). Dessa forma, a diminuição da ingestão de ácido graxo saturado e o aumento da ingestão de ácidos graxos poliinsaturados podem reduzir a concentração de leptina (RESELAND, 2001). Portanto, parece que o tipo de gordura na dieta também influencia a concentração plasmática de leptina (ROJO-MARTINEZ, 2000).

Dados do nosso grupo mostraram que o consumo de uma pequena quantidade de óleo de coco (CO), óleo vegetal composto por cerca de 90% de ácidos graxos saturados, dos quais 60 a 63% são ácidos graxos de cadeia média, por oito semanas acarretou aumento do peso, maior percentual de gordura, redução do gasto energético e desencadeou um perfil inflamatório tanto a nível central quanto periférico em camundongos *Swiss* saudáveis (VERAS et al, 2021). Com isso, torna-se importante investigar a ação da leptina frente as alterações metabólicas encontradas decorrentes da suplementação com óleo de coco. Nesse contexto, o objetivo geral do presente estudo foi investigar os efeitos da suplementação com óleo de coco na sinalização hipotalâmica da leptina em camundongos *Swiss*.

## **METODOLOGIA:**

Inicialmente, os procedimentos experimentais foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Utilizamos camundongos machos (*Mus Musculus*), da linhagem *Swiss*, com 5 semanas de vida e com peso aproximado de 20g, 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 cinco grupos experimentais e suplementados oralmente por 8 semanas com 300µL de água para o grupo controle (CV), com 100 ou 300µL de óleo de coco extravirgem (CO100 e CO300, respectivamente) e com 100 ou 300µL de óleo de soja (SO100 e SO300, respectivamente). Os volumes da suplementação foram pensados de acordo com a recomendação de ingestão de gordura saturada, que corresponde a no máximo 10% da dieta (REEVES et al, 1993), equivalendo a 100µL. Enquanto o volume de 300µL é uma quantidade supra fisiológica para mimetizar o consumo adicional do óleo de coco à dieta. Por fim, a massa corporal foi medida semanalmente.

Na oitava semana de suplementação, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e em seguida foram estimulados com leptina (5 mg/kg), via intraperitoneal. Posteriormente ao estímulo, os animais foram realimentados e testados, durante o período de vigília, no Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS, Columbus Instruments, Columbus, OH) para mensuração da

ingestão alimentar, gasto energético e quociente respiratório após três horas da injeção de leptina, conforme Garcia-Galiano et al (2017). O CLAMS foi instalado sob temperatura ambiente constante (22°C) e ciclo claro / escuro (12 h). Para este ensaio, os camundongos foram previamente adaptados, durante 12 horas, em gaiolas individuais.

Ao final do período de suplementação, a leptina (2.5 mg/g) foi administrada, via intraperitoneal, nos camundongos e após 30 minutos (GARCIA-GALIANO et al, 2017) os animais foram anestesiados, via intraperitoneal, com Ketamina (100 mg/kg) e Xilasina (5 mg/kg) e, posteriormente decapitados para a coleta do hipotálamo para as devidas análises moleculares (qPCR-real time e Western Blotting).

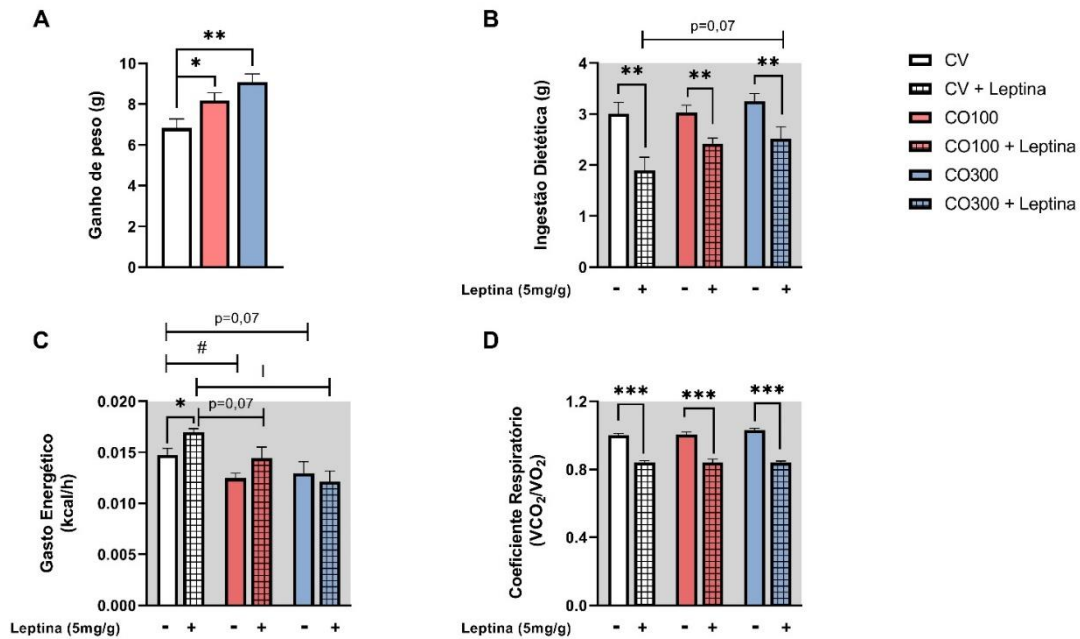
Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  SEM. Os efeitos da suplementação do óleo de coco foram comparados entre si e com o grupo controle, utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de Turkey. Para analisar a ação da leptina, entre dois grupos de amostras independentes, foi aplicado o teste T de Student. GraphPad Prism 8 foi o software aplicado a todas as análises estatísticas. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

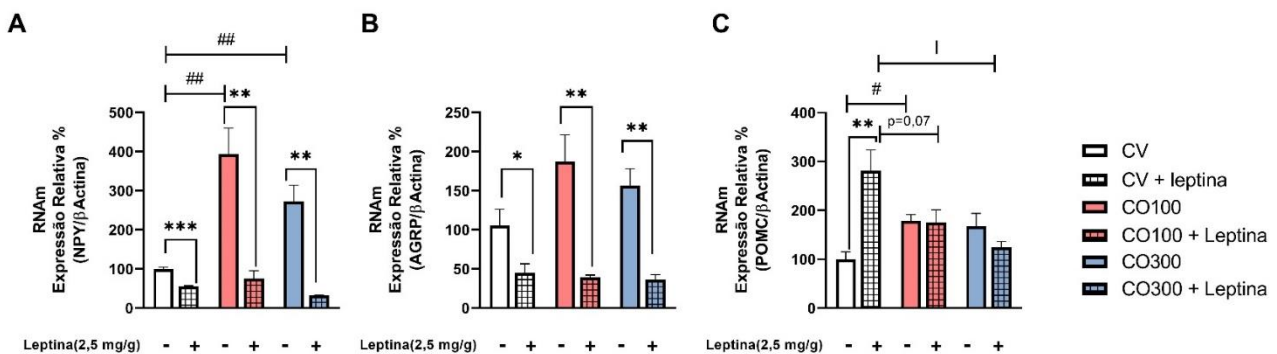
Os animais suplementados com óleo de coco, independentemente do volume, por 8 semanas, apresentaram tanto um aumento do ganho de peso corporal quanto redução do gasto energético, no ciclo escuro, quando comparado ao grupo controle (fig. 1a e 1c, respectivamente). Quanto a ingestão alimentar e ao coeficiente respiratório, observa-se que não houve diferença entre os grupos experimentais (fig. 1b e 1d, respectivamente). Entretanto, após o estímulo com leptina, nota-se uma diminuição no coeficiente respiratório e no consumo dietético de todos os grupos, apesar de nesse último parâmetro haver um tendência de redução menor para o grupo CO300 + leptina, quando comparado ao CV + leptina (fig. 1b e 1d, respectivamente). A administração da leptina aumentou o gasto energético do grupo CV. Contudo, a leptina não foi capaz de aumentar o gasto energético dos animais suplementados com CO (fig. 1c).

Para investigar a ação da leptina sob os neuropeptídeos, avaliou-se a expressão gênica de NPY, AGRP e POMC no hipotálamo dos animais suplementados com CO. Observa-se que houve um aumento do transcrito de NPY em ambos os grupos CO em relação ao grupo CV (fig. 2a). Além disso, a presença de leptina reduziu a expressão gênica tanto de NPY quanto de AGRP em todos os grupos (fig. 2a e 2b), bem como aumentou o transcrito de POMC apenas no grupo CV, ou seja, a leptina não foi eficaz em elevar a expressão gênica de POMC nos animais suplementados com CO (fig. 2c).

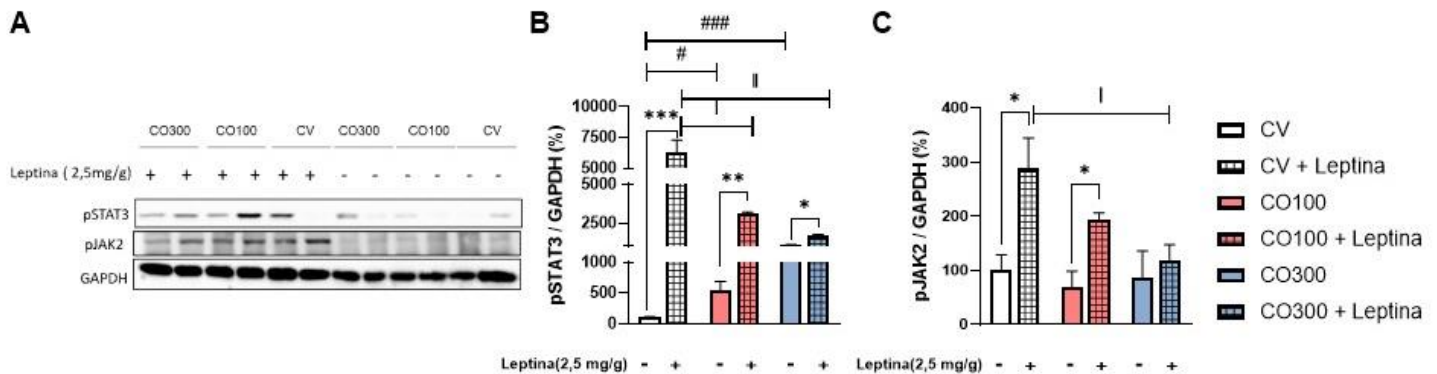
Em seguida, avaliou-se os efeitos da suplementação com CO na via de sinalização da leptina no hipotálamo. E percebe-se um aumento da fosforilação de STAT3 nos grupos CO100 e CO300 em relação ao CV (fig. 3b). Tal fato pode ter ocorrido devido ao quadro inflamatório, incluindo aumento do transcrito de IL-6 no hipotálamo, desencadeado pela suplementação com CO como observado no estudo anterior do nosso grupo (VERAS et al, 2021). Todavia, nos grupos CO100 e CO300 a leptina não foi capaz de promover a fosforilação de STAT3, no hipotálamo, nos mesmos níveis do observado no grupo CV (fig. 3b). Por outro lado, o estímulo com leptina aumentou a fosforilação de JAK2 nos grupos CV e CO100, mas não no grupo CO300.



**Figura 1. Mensuração de ganho de peso e parâmetros metabólicos por respirometria após 8 semanas de suplementação com óleo de coco (CO100 ou CO300) ou água (CV) e estímulo com leptina.** (A) Ganho de peso ao final do período de suplementação; (B) Ingestão Alimentar ao final do período de suplementação e após 3 horas do estímulo com leptina (5mg/g); (C) Gasto Energético ao final do período de suplementação e após 3 horas do estímulo com leptina (5mg/g); (D) Coeficiente Respiratório ao final do período de suplementação e após 3 horas do estímulo com leptina (5mg/g). Dados são mostrados como média± SEM; # vs. CV; \* vs. respectivo grupo sem estímulo com leptina; † vs. CV + Leptina, indicam diferenças estatísticas para  $p < 0.05$ ;  $n = 4-10$  animais por grupo.



**Figura 3. Expressão gênica de RNAm de Neuropeptídeos no hipotálamo de camundongos suplementados por 8 semanas com óleo de coco (CO100 ou CO300) ou água (CV) e estimulados, via IP, com leptina (2,5 mg/g). (A) NPY; (B) AGRP; (C) POMC. Dados são mostrados como média± SEM; # vs. CV; \* vs. respectivo grupo sem estímulo com leptina; † vs. CV + Leptina, indicam diferenças estatísticas para p<0.05; n = 4 por grupo.**



**Figura 2. Expressão proteica no hipotálamo de camundongos suplementados por 8 semanas com óleo de coco (CO100 ou CO300) ou água (CV) e estimulados, via IP, com leptina (2,5 mg/g). (A) Representação do Western Blotting (B) pSTAT3; (C) pJAK2. Dados são mostrados como média± SEM; # vs. CV; \* vs. respectivo grupo sem estímulo com leptina; † vs. CV + Leptina, indicam diferenças estatísticas para p<0.05; n = 3 animais por grupo.**

## CONCLUSÃO:

O consumo de CO, por 8 semanas pode desencadear a resistência central a leptina nos camundongos *Swiss* saudáveis com efeitos importantes sobre o gasto energético e expressão de neuropeptídeos.

## REFERÊNCIAS

- CONE RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nature Neuroscience**, v. 8 p. 571–578, 2005.
- GARCIA-GALIANO, D. et al. PI3K $\alpha$  inactivation in leptin receptor cells increases leptin sensitivity but disrupts growth and reproduction. **JCI Insight**, v. 2, n. 23, 2017.
- MORRIS, D.; RUI, L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297: p. 1247–1259, 2009.
- PURKAYASTHA, S.; CAI, D. Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome. **Mol Metab**, v. 2, p. 356–363, 2013.
- REEVES, P. G. et al. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.
- RESELAND, J. et al., Effect of long-term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations, **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 240–45, 2001.
- ROJO-MARTINEZ, G. et al. Serum leptin and habitual fatty acid dietary intake in patients with type 1 diabetes mellitus. **European Journal of Endocrinology**, v. 142, p. 263–68, 2000.
- THALER, J. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 153–162, 2012.
- VAN DIJK, S. et al. A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, p. 1656–1664, 2009.
- VELLOSO, L.; SCHWARTZ, M. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. **International Journal of Obesity**, v. 35, p. 1455–1465, 2011.
- VERAS, A. et al. Low-dose coconut oil supplementation induces hypothalamic inflammation, behavioral dysfunction and metabolic damage in healthy mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 1, p. 1-1, 2021.
- WANG, X. et al. Increased hypothalamic inflammation associated with the susceptibility to obesity in rats exposed to high-fat diet. **Exp Diabetes Res**, v. 2012, 2012.
- YAZDI, F.; CLEE, S.; MEYRE, D. Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. **PeerJ**, v. 3, 2015.
- ZHOU, Y.; RUI L. Leptin signaling and leptin resistance. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 1–16, 2013.