



AÇÃO DA LEPTINA NO METABOLISMO LIPÍDICO NO TECIDO ADIPOSEO DE CAMUNDONGOS SWISS SAUDÁVEIS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE COCO

Palavras-Chave: Óleo de Coco, Leptina, Tecido Adiposo

Autores/as:

LARISSA DA SILVA BRUZASCO [FCA-UNICAMP]

ANA BEATRIZ PROFIRO LOPES [FCA-UNICAMP]

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

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

INTRODUÇÃO:

A leptina é uma adipocina secretada pelos adipócitos que desempenha papel importante na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético ⁽¹⁾. A ação da leptina acontece por meio dos seus receptores, que por sua vez são expressos em diversos tecidos, incluindo o tecido adiposo ⁽²⁾. No tecido adiposo, a leptina aumenta o sinal eferente simpático ao tecido adiposo branco para aumentar a lipólise ⁽³⁾.

Estudos *in vivo* ⁽⁴⁾ e *in vitro* ⁽⁵⁾ indicam que a leptina possui propriedades pró-inflamatórias. Sabe-se que a obesidade é reconhecida como uma condição inflamatória crônica de baixo grau ⁽⁶⁾ e que citocinas pró-inflamatórias contribuem para o desenvolvimento associado de comorbidades ⁽⁷⁾. Bullo et al ⁽⁸⁾ demonstraram uma correlação entre a expressão da leptina do tecido adiposo e marcadores de inflamação, portanto o cenário de maior gordura corporal parece ser aquele em que a hiperleptinemia tem o potencial de promover a inflamação e influenciar indiretamente o metabolismo dos adipócitos ⁽⁹⁾. 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 ⁽¹⁰⁾.

Por fim, a ingestão de nutrientes afeta a regulação da expressão da leptina visto que uma maior ingestão de gordura na dieta está positivamente correlacionada com as concentrações plasmáticas de leptina ⁽¹¹⁾. Além disso, pesquisas relataram que a ingestão alimentar de ácidos graxos pode afetar e regular a atividade gênica nos tecidos adiposos ⁽¹²⁾. Ainda, a diminuição da ingestão de ácidos graxos saturados (AGS) pode reduzir a concentração de leptina ⁽¹³⁾.

Contudo, estudos apontam que a gordura saturada de fontes como óleo de coco, que por sua vez é rico em ácido graxo saturado de cadeia média (AGCM), pode desempenhar papel benéfico tanto na prevenção quanto no tratamento da síndrome metabólica ⁽¹⁴⁾. Tal fato está relacionado com a metabolização dos ACGM, que são absorvidos diretamente no intestino e são transportados, através

do sistema portal, o que facilita o metabolismo hepático e a oxidação mitocondrial ⁽¹⁵⁾. Portanto, os AGCM são utilizados como substratos energéticos, rapidamente. Conseqüentemente, são menos suscetíveis a deposição como gordura no tecido adiposo ⁽¹⁶⁾.

Além de controvérsias entre as pesquisas científicas já que vários estudos associaram o óleo de coco tanto a níveis mais altos de LDL quanto a maiores riscos para doenças cardiovasculares e prejuízos na memória ⁽¹⁷⁾. Dados do nosso grupo mostraram que o consumo de uma pequena quantidade de óleo de coco por oito semanas acarretou aumento do peso, maior percentual de gordura, redução do gasto energético e desencadeou um perfil inflamatório no tecido adiposo de camundongos *Swiss* saudáveis ⁽¹⁸⁾. 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 do presente trabalho foi investigar os efeitos da suplementação, por 8 semanas, com óleo de coco na sinalização da leptina no tecido adiposo epididimal de camundongos *Swiss* saudáveis.

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 ⁽¹⁹⁾, 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.

Ao final do período de suplementação, a leptina (2.5 mg/g) foi administrada, via intraperitoneal, nos camundongos e após 30 minutos ⁽²⁰⁾ os animais foram anestesiados, via intraperitoneal, com Ketamina (100 mg/kg) e Xilasina (5 mg/kg) e, posteriormente decapitados para a coleta do tecido adiposo epididimal 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 estatisticamente significantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os animais suplementados com óleo de coco, independentemente do volume, por 8 semanas, apresentaram aumento do ganho de peso corporal, contudo não houve diferença entre os grupos no que tange a ingestão alimentar.

Inicialmente, investigamos os efeitos da suplementação com óleo de coco na via de sinalização da leptina no tecido adiposo epididimal e observamos que apenas o consumo de CO não induziu a fosforilação de STAT3 e de JAK2 (fig. 1b e fig. 1c). Entretanto, após o estímulo com leptina percebe-se aumento da fosforilação tanto de STAT3 (pSTAT3) no grupo CV e CO100 (fig. 1b) quanto de pJAK2 no grupo CV (fig.1c). Todavia, no grupo CO300 a leptina respondeu com menos intensidade para a fosforilação de STAT3, quando comparado com o CV + leptina (fig 1b). Ao mesmo tempo, a administração da leptina não foi capaz de aumentar a fosforilação de JAK2 no tecido adiposo epididimal de animais suplementados com óleo de coco (fig. 1c). Tal resultado sugere uma possível resistência a leptina ⁽²¹⁾. Em consonância, Wang et al ⁽²²⁾ propuseram que o tecido adiposo branco desenvolve resistência local à leptina quando a ativação do STAT3 foi diminuída no tecido adiposo de animais obesos induzidos por dieta e estimulados com leptina. A suplementação com óleo de coco reduziu a fosforilação de AMPK, quando comparado ao CV (fig. 1d). Por sua vez, o estímulo com leptina aumentou a fosforilação de AMPK em todos os grupos experimentais (fig. 1d). A AMPK fosforila e inibe a Acetil-CoA Carboxilase (ACC), o que inibe a síntese de ácidos graxos e favorece a oxidação ⁽²³⁾.

Em seguida, avaliamos se a administração da leptina interferiria na oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo epididimal dos animais que consumiram óleo de coco. Observamos que apenas o consumo de óleo de coco no volume de 100ul aumentou a expressão proteica de ACADvl e a presença da leptina levou a um aumento tanto do conteúdo proteico de ACADvl quanto do transcrito de ACADvl nos grupos CV e CO100 (fig. 1e e 2b, respectivamente), apenas no grupo CO300 a leptina não foi capaz de induzir resposta (fig. 1e e 2b). Por fim, notamos um aumento da expressão gênica de mACAD no grupo CO300 quando comparado ao CV (fig. 2a). Contudo, a presença de leptina aumentou os níveis de transcritos de mACAD apenas nos grupo CV e CO100 (fig. 2a), ou seja, ao estímulo com leptina não foi capaz de aumentar a oxidação de ácidos graxos no grupo CO300 e sabe-

se que a leptina induz a oxidação de ácidos graxos ⁽²⁴⁾. Em conjunto, esses resultados mostram a diminuição da resposta a leptina. Alguns estudos demonstram que o desenvolvimento da resistência à leptina pode ser dependente do tipo de alimento e da duração da dieta ^(25, 26).

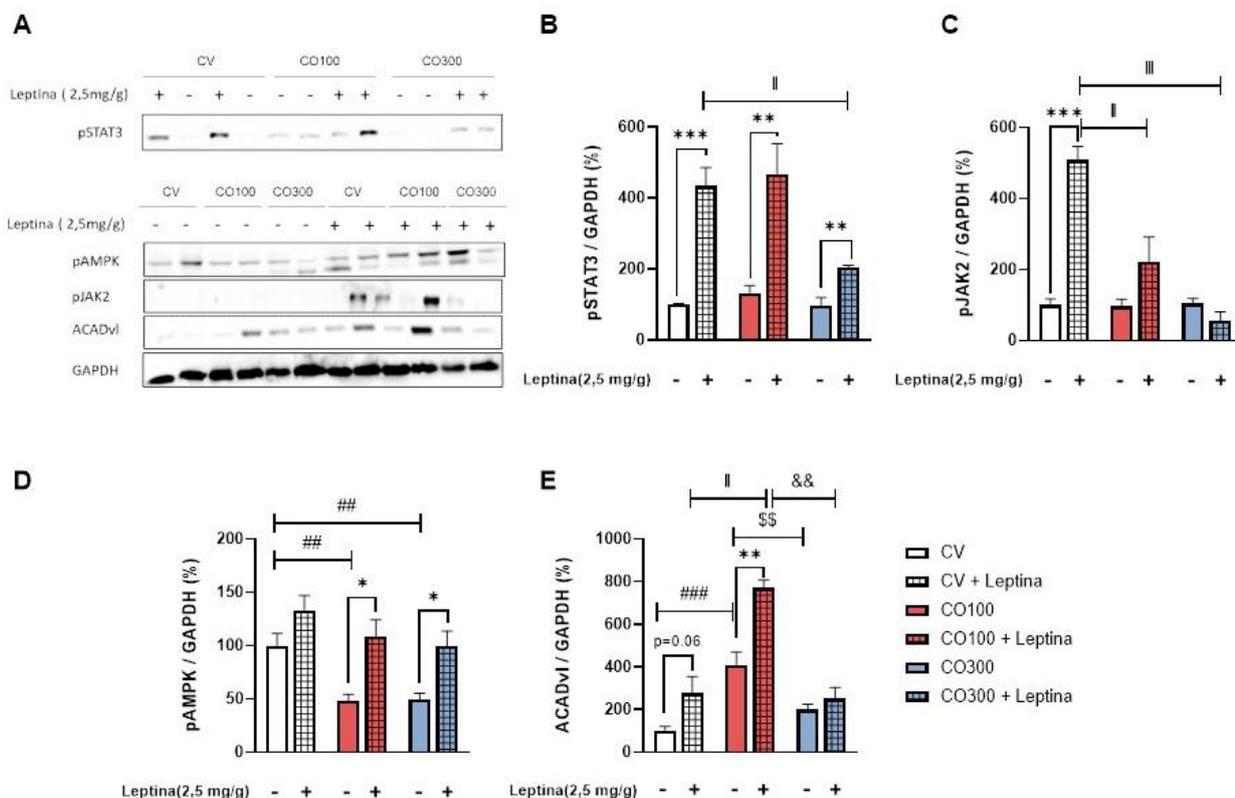


Figura 1. Expressão proteica no tecido adiposo epididimal de camundongos suplementados por 8 semanas com óleo de coco (CO100 ou CO300) ou água (CV) e estimulados, via IP, com leptina (2,5 mg/g). (A) Representação do Western Blotting; (B) pSTAT3; (C) pJAK2; (C) pAMPK; (D) ACADvl. Dados são mostrados como média± SEM; # vs. CV; * vs. respectivo grupo sem estímulo com leptina; † vs. CV + Leptina; \$\$ CO100 vs. CO300; && CO100 + leptina vs. CO300 + leptina, indicam diferenças estatísticas para $p < 0.05$; $n = 3$ animais por grupo.

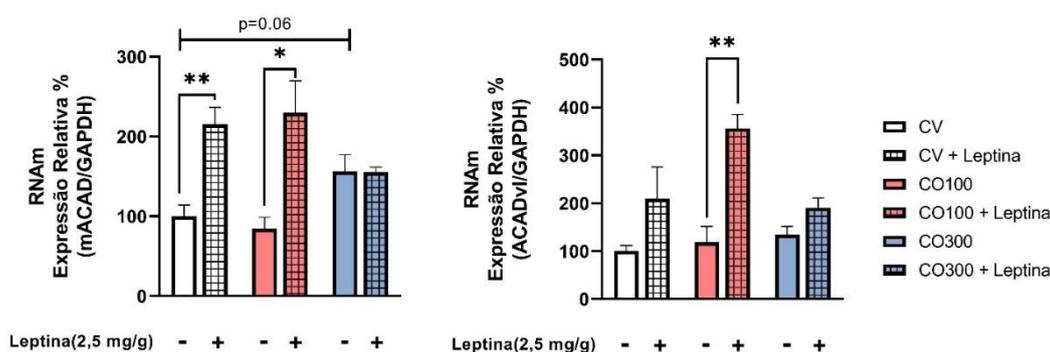


Figura 2. Expressão gênica de RNAm no tecido adiposo epididimal de camundongos suplementados por 8 semanas com óleo de coco (CO100 ou CO300) ou água (CV) e estimulados, via IP, com leptina (2,5 mg/g). (A) mACAD; (B) ACADvl. Dados são mostrados como média± SEM; # vs. CV; * vs. respectivo grupo sem estímulo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

CONCLUSÃO:

A suplementação com óleo de coco por 8 semanas, especialmente no volume de 300 ul, parece desencadear resistência a leptina no tecido adiposo de camundongos *Swiss* saudáveis.

REFERENCIAS:

- (1) ZHOU, Y.; RUI L. Leptin signaling and leptin resistance. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 1–16, 2013.
- (2) BORNSTEIN, S. *et al.* Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. **Diabetes**, v. 9, p. 532–538, 2000.
- (3) GEERLING, J. *et al.* Sympathetic nervous system control of triglyceride metabolism: novel concepts derived from recent studies. **Journal of lipid research**, v. 55, p.180–189, 2014.
- (4) FAGGIONI, R. *et al.* Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 2367–2372, 2000.
- (5) SHEN, J. Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. **Life Sci**, v. 77, p.1502–1515, 2005.
- (6) SUN, S. *et al.* Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. **Annu Rev Nutr**, v.32, p. 261–286, 2012
- (7) HOTAMISLIGIL, G. *et al.* Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 4854–4858, 1994.
- (8) BULLO, M. *et al.* Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obes Res.**, v. 11, p. 525–531, 2003.
- (9) STERN, J.; Rutkowski1, J.; SCHERER, P. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis Through Adipose Tissue Crosstalk. **Cell Metab**, v.23, n.5, 2016.
- (10) YAZDI, F.; CLEE, S.; MEYRE, D. Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. **Peer J**. v. 3, 2015.
- (11) COOLING, J.; BARTH, J.; BLUNDELL, J. The high-fat phenotype: is leptin involved in the adaptive response to a high fat (high energy) diet? **International Journal of Obesity**, v. 22, p. 1132–1135, 1998.
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) NAGAO, K.; YANAGITA T. Medium-chain fatty acids: functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v.61, p. 208–212, 2010.
- (15) FIGUEIREDO-SILVA, A. *et al.* Link between lipid metabolism and voluntary food intake in rainbow trout fed coconut oil rich in medium-chain TAG. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 11, p. 1714- 1725, 2012.
- (16) THOLSTRUP, T. *et al.* Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n.4, p. 564-9.
- (17) NEVIN, K.G.; RAJAMOHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 830–835, 2004
- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) GARCIA-GALIANO, D. *et al.* PI3K α inactivation in leptin receptor cells increases leptin sensitivity but disrupts growth and reproduction. **JCI Insight**, v. 2, n. 23, 2017.
- (21) PARK, H.; AHIMA, R. Leptin signaling. **F1000Prime Rep**, v.6, n. 73, 2014.
- (22) WANG, Z. *et al.* Leptin resistance of adipocytes in obesity: role of suppressors of cytokine signaling. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 277, p. 20–26, 2000
- (23) Garcia, D.; Shaw, R. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell*. v. 66, n. 6, 2017.
- (24) WILLIAM, W.; CEDDIA, R.; CURI, R. Leptin controls the fate of fatty acids in isolated rat white adipocytes. **The Journal of endocrinology**, v.175, p.735–744, 2002.
- (25) HARING, S. J.; HARRIS, R. B. The relation between dietary fructose, dietary fat and leptin responsiveness in rats. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 5, p. 914–922, 2011.
- (26) HEUVEL, J. K. *et al.* Neuropeptide Y and leptin sensitivity is dependent on diet composition. **Journal of neuroendocrinology**, v. 26, n. 6, p. 377–385, 2014.