



# **EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO CRÔNICO SOBRE O METABOLISMO DE NAD<sup>+</sup> E SOBRE A UPRmt EM CAMUNDONGOS.**

**Palavras-Chave: NAD<sup>+</sup>, UPRmt, Exercício.**

**Autores/as:**

**Saulo Gabriel do Nascimento Della Coleta [Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP]**

**Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle [Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP]**

---

## **INTRODUÇÃO:**

A doença esteatótica não alcoólica do fígado (NAFLD, do inglês nonalcoholic fatty liver disease) é a causa mais comum de doenças crônicas no fígado de indivíduos obesos e sua prevalência continua a crescer em todo o mundo (GARIANI et al., 2016). A NAFLD, possui estreita relação com a resistência à insulina, disfunção mitocondrial, inflamação, aumento da gliconeogênese dentre outros (SUNNY et al., 2011). Nesse contexto, a lipotoxicidade hepática pode ser considerada como um fenômeno crítico no desenvolvimento da NAFLD. A lipotoxicidade é resultado do excesso de AGs no fígado, sobrecarregando as capacidades hepáticas de oxidar, armazenar e exportar lipídeos, além de prejudicar as vias de sinalização celular, causando disfunção celular, liberação de marcadores inflamatórios, como o Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e podendo levar a morte celular (FELDSTEIN et al., 2004; TILG; MOSCHEN, 2010). Portanto, a NAFLD pode progredir até a esteato-hepatite não alcoólica (NASH, do inglês nonalcoholic steatohepatitis), fibrose e finalmente cirrose (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011).

As mitocôndrias são organelas especializadas nos processos de respiração celular e produção de energia. Isso acontece principalmente na cadeia transportadora de elétrons (CTE). A baixa capacidade oxidativa por parte das mitocôndrias nos hepatócitos pode contribuir de maneira significativa para o excesso de gordura no fígado. Um consistente acumulado de estudos destaca a disfunção mitocondrial hepática como um fenômeno intracelular crítico para o desenvolvimento da NAFLD (GARIANI et al., 2016). Recentemente, o metabolismo de NAD<sup>+</sup> (do inglês, nicotinamide adenine dinucleotide) tem sido investigado na etiopatogenia da NAFLD. A molécula de NAD<sup>+</sup> é um cofator que atua em reações metabólicas distintas e serve como substrato para diversas enzimas, como

por exemplo as enzimas dependentes de NAD, com destaque para as sirtuínas, as poli ADP-ribose polimerases (PARP) e as ADP-ribose sintase cíclicas (cADPR), como CD38 e CD137.

Gariani e colaboradores observaram uma queda significativa dos níveis intracelulares de NAD<sup>+</sup> no fígado de camundongos obesos com NAFLD (GARIANI et al., 2016). Para determinar se a recuperação dos níveis de NAD<sup>+</sup> poderia exercer algum efeito no desenvolvimento da NAFLD, os autores realizaram a suplementação oral com um precursor de NAD<sup>+</sup>, um derivado da vitamina B3, o ribosídeo de nicotinamida (NR) durante 8 semanas. De maneira interessante, o NR recuperou os níveis de NAD<sup>+</sup>, a função mitocondrial e o metabolismo hepático em camundongos (GARIANI et al., 2016). Mecanicamente, o aumento dos níveis de NAD<sup>+</sup> no tecido hepático estimulou a atividade da SIRT1 e desencadeou diversos marcadores da UPRmt (do inglês mitochondrial unfolded protein response).

A UPRmt é um processo através do qual se reestabelece a proteostase mitocondrial em situações de estresse (QURESHI; HAYNES; PELLEGRINO, 2017), que podem levar à síntese de proteínas mal formadas nessa organela (MOUCHIROUD et al., 2013). Nesse contexto, há um desequilíbrio entre proteínas codificadas pelo DNAn e proteínas codificadas pelo DNAm, que pode ser demonstrado pela razão SDHA/MTCO1 e que é fundamental para a ativação da UPRmt. Moléculas como a ATFS1 em *c. elegans* e a ATF5 em mamíferos desempenham o papel de identificar o desequilíbrio da proteostase mitocondrial e sinalizar por meio de fatores de transcrição o DNAn. Em seguida, genes que codificam proteases e chaperonas são ativados a partir do DNAn. Assim, chaperonas como as proteínas de choque térmico (heat shock protein - HSP) HSP10 e HSP60 e proteases como a ClpP (Caseinolytic Mitochondrial Matrix Peptidase Proteolytic Subunit), a LONP1 (Lon protease homolog, mitochondrial), entre outras, são importadas do citosol para o interior das mitocôndrias para que ocorra o reparo de proteínas malformadas por ação das chaperonas ou a completa degradação dessas proteínas por ação das proteases (YONEDA et al., 2004; ZHAO et al., 2002). Contudo, os efeitos do exercício físico sobre o metabolismo de NAD<sup>+</sup> e a UPRmt no tecido hepático ainda são desconhecidos, portanto o objetivo do projeto foi avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre o metabolismo de NAD<sup>+</sup> e sobre os marcadores da UPRmt no tecido hepático de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

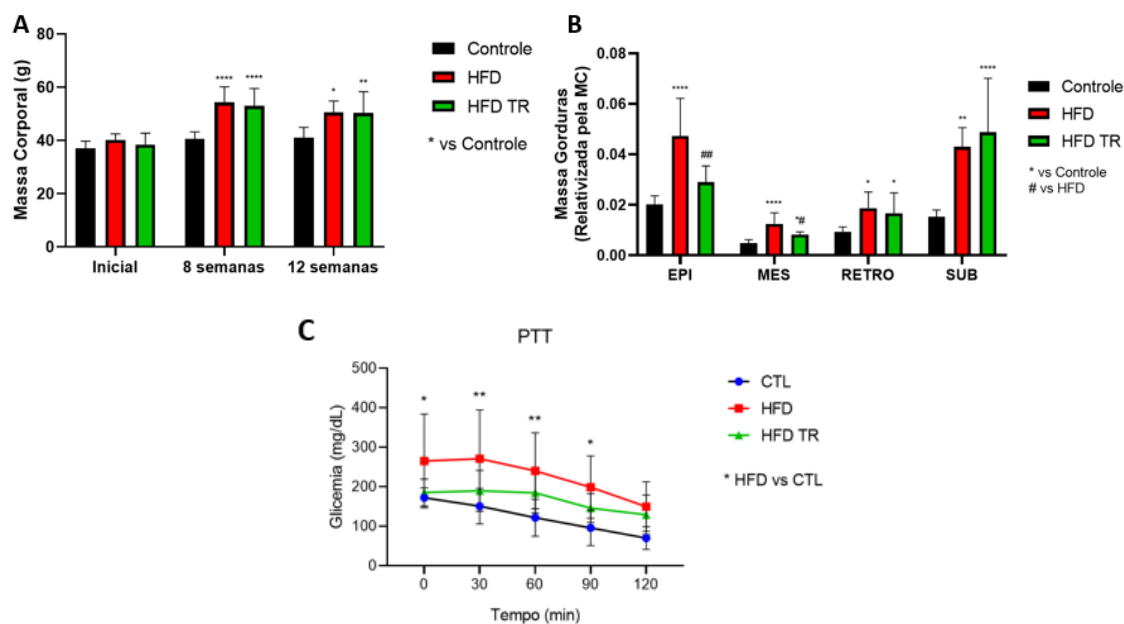
## **METODOLOGIA:**

Foram utilizados camundongos Swiss os quais foram divididos em 3 grupos: Controle, HFD sedentário e HFD treinado. O grupo controle foi alimentado com dieta padrão para roedores, enquanto que os grupos HFD (High Fat Diet) foram alimentados com uma dieta rica em gorduras durante 8 semanas e, ao fim desse período, o grupo treinado iniciou o protocolo de exercício físico em esteira com duração de 4 semanas. Após o fim do

protocolo, os animais foram eutanasiados e foram realizadas análises fisiológicas e moleculares, através da técnica de Western blotting, para avaliarmos os efeitos da intervenção realizada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

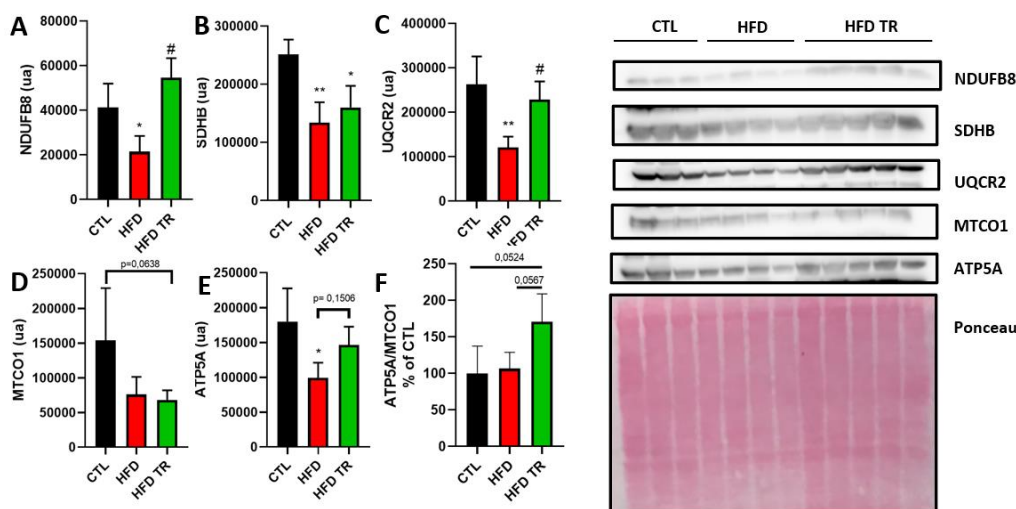
Durante todo o protocolo de treinamento físico foram realizadas medições da massa corporal dos animais, através das quais podemos observar as variações nessas massas no início do protocolo, após 8 semanas de consumo de HFD e ao final do protocolo, após as 4 semanas de exercício. Após as primeiras 8 semanas houve um aumento significativo na massa corporal dos grupos HFD e HFD TR em relação ao grupo controle, diferença que se manteve ao final do protocolo (Figura 1a). Após a eutanásia, também avaliamos a massa de algumas porções do tecido adiposo branco dos animais e pudemos observar uma redução significativa na gordura visceral (epididimal e mesentérica) no grupo treinado em relação ao HFD sedentário, mesmo sem diferença na massa corporal (Figura 1b). Também foi realizado um teste de tolerância ao piruvato (PTT) com o objetivo de avaliar a produção hepática de glicose (PHG) desses animais (Figura 1c). Os resultados mostram que o grupo HFD sedentário apresentou uma menor tolerância ao piruvato, indicando uma desregulação da PHG.



**Figura 1 – “Dados Fisiológicos dos camundongos Swiss”.** (A) Massa corporal dos animais no início do protocolo, após 8 semanas de consumo de HFD e após 4 semanas de exercício físico. (n=6-10). 8 semanas \*\*\*\*p<0,0001 vs CTL; 12 semanas \*p<0,05 e \*\*p<0,01 vs CTL. (B) Massa dos tecidos adiposos Epididimal, Mesentérico, Retroperitonial e Subcutâneo. (n=6-10). Epididimal \*\*\*\*p<0,0001 vs CTL e ##p<0,003 vs HFD; Mesentérica \*\*\*\* p<0,0001, \*p<0,05 vs CTL e #p<0,05 vs HFD; Retroperitonial \*p<0,05 vs CTL; Subcutânea \*\*p<0,01 e \*\*\*\*p<0,0001. (C) Teste de tolerância ao piruvato. (n=10) \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs CTL.

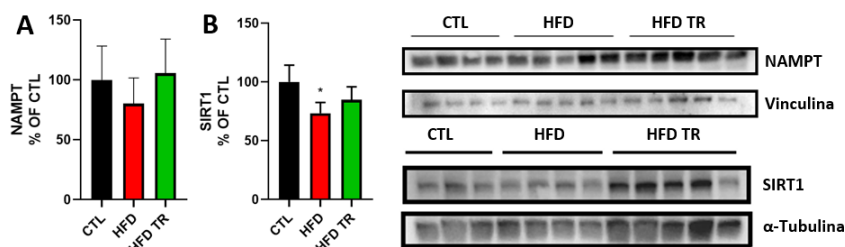
Além disso, foram utilizados fragmentos do fígado dos animais para análises do conteúdo de diversas proteínas nesse tecido. Ao analisarmos proteínas marcadoras da cadeia transportadora de elétrons

(CTE/OXPHOS), podemos observar um aumento de algumas dessas proteínas no grupo HFD em relação aos outros dois grupos, além de um aumento no grupo treinado (Figura 2).



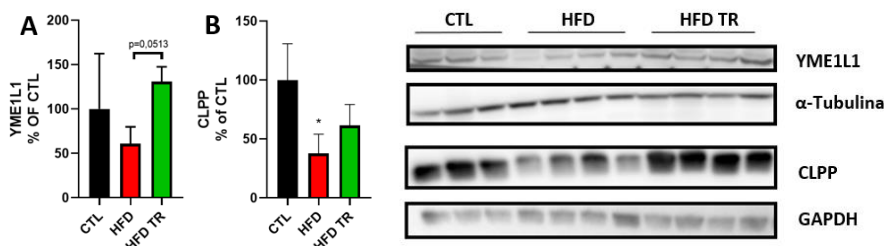
**Figura 2 – “Marcadores da OXPHOS e Desequilíbrio Mitonuclear”.** CTL (n=3), HFD (n=4), HFD TR (n=5). (A) NDUFB8. \* $p < 0,05$  vs CTL e # $p < 0,05$  vs HFD. (B) SDHB. \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  vs CTL. (C) UQCRC2. \*\* $p < 0,01$  vs CTL e # $p < 0,05$  vs HFD. (D) MTCO1.  $p = 0,0638$  CTL vs HFD TR. (E) ATP5A. \* $p < 0,05$  vs CTL e  $p = 0,1506$  HFD vs HFD TR. (F) ATP5A/MTCO1.  $p = 0,0524$  CTL vs HFD TR e  $p = 0,0567$  HFD vs HFD TR.

Também analisamos proteínas relacionadas com o metabolismo de NAD<sup>+</sup>. Não encontramos diferença estatística no conteúdo de NAMPT (Figura 3a), proteína da via de síntese de NAD<sup>+</sup>, apesar de observarmos uma tendência de redução no grupo HFD. Vimos também uma redução da proteína SIRT1 no grupo HFD (Figura 3b), proteína esta que usa NAD<sup>+</sup> como substrato e está relacionada com a UPRmt.



**Figura 3 – “Expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo de NAD<sup>+</sup>”.** (A) Expressão proteica de NAMPT. CTL (n=4), HFD (n=5), HFD TR (n=5). (B) Expressão proteica de SIRT1. CTL (n=3), HFD (n=4), HFD TR (n=4). \* $p < 0,04$  CTL vs HFD.

Partindo para os marcadores da UPRmt, vemos uma redução do conteúdo de CLPP no grupo HFD (Figura 4b) e uma tendência de redução de YME1L1 nesse mesmo grupo (Figura 4a), o indicando uma menor ativação dessa via nesses animais.



**Figura 4 – “Marcadores da UPRmt”.** CTL (n=3), HFD (n=4), HFD TR (n=4). (A) Expressão proteica de YME1L1. p=0,0513 HFD vs HFD TR. (B) Expressão proteica de CLPP. \*p<0,05 vs CTL.

## CONCLUSÕES:

Com os resultados apresentados acima podemos concluir que o exercício foi efetivo em melhorar ou evitar prejuízos em parâmetros fisiológicos como: a massa de gordura visceral, cujo acúmulo está relacionado com diversas desordens metabólicas, e na tolerância ao piruvato, um bom indicativo da PHG. Além disso, as análises moleculares mostraram benefícios do exercício para alguns componentes da CTE. Contudo, nossos resultados sugerem que o treinamento aeróbio não alterou o conteúdo proteico das proteínas relacionadas com o metabolismo de NAD<sup>+</sup>, bem como alguns marcadores da UPRmt. Portanto, concluímos que o exercício físico trouxe benefícios, tanto globais, quando para o tecido hepático dos animais, porém acreditamos que são necessárias mais análises que comprovem a relação entre a maior disponibilidade de NAD<sup>+</sup> com o exercício físico e sua relação com a UPRmt no tecido hepático.

---

## BIBLIOGRAFIA

- COHEN, Jonathan C.; HORTON, Jay D.; HOBBS, Helen H. Human fatty liver disease: Old questions and new insights. **Science** 2011. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.1204265.
- FELDSTEIN, Ariel E.; WERNEBURG, Nathan W.; CANBAY, Ali; GUICCIARDI, Maria Eugenia; BRONK, Steven F.; RYDZEWSKI, Robert; BURGART, Laurence J.; GORES, Gregory J. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. **Hepatology**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 185–194, 2004. ISSN: 02709139. DOI: 10.1002/hep.20283.
- GARIANI, Karim et al. Eliciting the Mitochondrial Unfolded Protein Response by Nicotinamide Adenine Dinucleotide Repletion Reverses Fatty Liver Disease in Mice. **HEPATOLOGY**, [S. l.], v. 63, p. 1190–1204, 2016. DOI: 10.1002/hep.28245/supinfo.
- MOUCHIROUD, Laurent et al. The NAD<sup>+</sup>/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. **Cell**, [S. l.], v. 154, n. 2, p. 430, 2013. ISSN: 10974172. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.016.
- QURESHI, Mohammed A.; HAYNES, Cole M.; PELLEGRINO, Mark W. The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse. **Journal of Biological Chemistry** American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 2017. ISSN: 1083351X. DOI: 10.1074/jbc.R117.791061.
- SUNNY, Nishanth E.; PARKS, Elizabeth J.; BROWNING, Jeffrey D.; BURGESS, Shawn C. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 804–810, 2011. ISSN: 15504131. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.11.004.
- TILG, Herbert; MOSCHEN, Alexander R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 1836–1846, 2010. ISSN: 02709139. DOI: 10.1002/hep.24001.
- YONEDA, Takunari; BENEDETTI, Cristina; URANO, Fumihiko; CLARK, Scott G.; HARDING, Heather P.; RON, David. Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 117, n. 18, p. 4055–4066, 2004. ISSN: 00219533. DOI: 10.1242/jcs.01275.
- ZHAO, Quan; WANG, Jianghui; LEVICHKIN, Ilya V.; STASINOPOULOS, Stan; RYAN, Michael T.; HOOGENRAAD, Nicholas J. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 21, n. 17, p. 4411–4419, 2002. DOI: 10.1093/emboj/cdf445.