

Efeito da dieta hiperlipídica e do treinamento físico sobre a UPRmt no tecido adiposo de camundongos obesos

Palavras-Chave: Exercício físico, UPRmt, mitocôndria

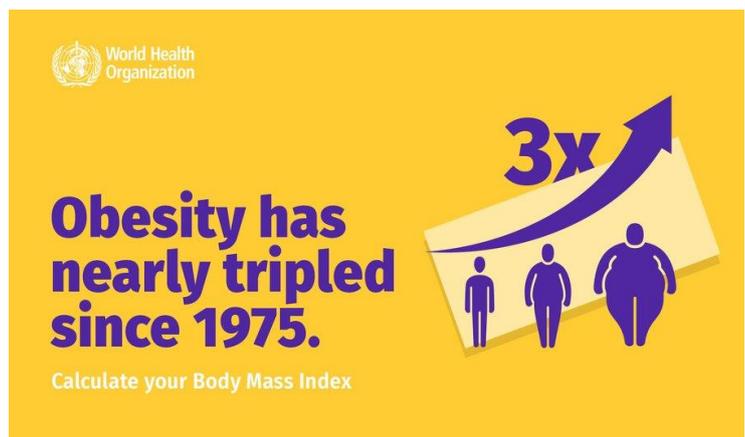
Autores:

Scylas José de Andrade Junior [UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Eduardo Rochete Ropelle [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

Conforme algumas estimativas globais da OMS em 2016, no mundo todo os níveis de obesidade quase que triplicaram desde 1975, onde cerca de 39% de adultos com 18 anos ou mais estavam com sobrepeso em 2016, e 13% apresentavam obesidade, que se desenvolve justamente no tecido adiposo, que é o principal órgão responsável pelo armazenamento de energia do corpo humano, acarretando uma série de disfunções no metabolismo. O que tem preocupado especialistas é o fato de que outras doenças estão diretamente relacionadas com a obesidade, tais como: diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e diversos tipos de câncer.



Diante desse cenário, estudos sobre a mitocôndria têm ganhado grande relevância no âmbito acadêmico, uma vez que uma das principais funções desta organela é produzir energia para a célula em forma de Trifosfato de Adenosina (ATP) por meio da fosforilação oxidativa. Aliás, estudos mostram que uma dieta hiperlipídica reduz a expressão de genes necessários para o funcionamento da fosforilação oxidativa (Sparks et al. 2005), e consequentemente ocorre uma alteração na função mitocondrial.

A UPRmt

Constantemente, as mitocôndrias são expostas a diversos tipos de estresse, modificando significativamente a atividade mitocondrial, porém dada a complexidade da mitocôndria, esta organela possui um controle de qualidade extremamente organizado, posto que qualquer disfunção desencadeia na decadência da função celular, portanto esse aparato de controle de qualidade mitocondrial, denominado *Unfolded Protein Response* (UPRmt), torna-se essencial para manter a proteostase e a função mitocondrial diante dos variados níveis de danos proteotóxicos, como por exemplo, o acúmulo de proteínas no citoplasma que resultará em um desbalanço proteico (3).

A UPRmt é um mecanismo que tem como objetivo principal garantir a função e a integridade das proteínas mitocondriais. Para isto, a UPRmt aumenta a capacidade de dobramento de proteínas e diminui

a síntese de proteínas, a fim de atenuar, por exemplo, o quadro de desbalanço proteico, ocasionado pelo acúmulo de proteínas no citoplasma, além de aumentar a degradação de proteínas malformadas (3-4).

No decorrer da resposta mitocondrial, as chaperonas (como HSP60) e as proteostases (como a Lonp1, a Yme1L1 e a ClpP) mitocondriais garantem a qualidade do balanço proteico no citoplasma. As chaperonas auxiliam na importação, no transporte, na dobragem e montagem dos complexos proteicos, já as proteostases garantem a degradação de proteínas que apresentam danos irreversíveis (5). Em um estudo demonstrou-se que a proteostase mitocondrial ClpP aliviou o desequilíbrio da dinâmica e da função mitocondrial induzida pela alta glicose e gordura na dieta em células Min6. (6)

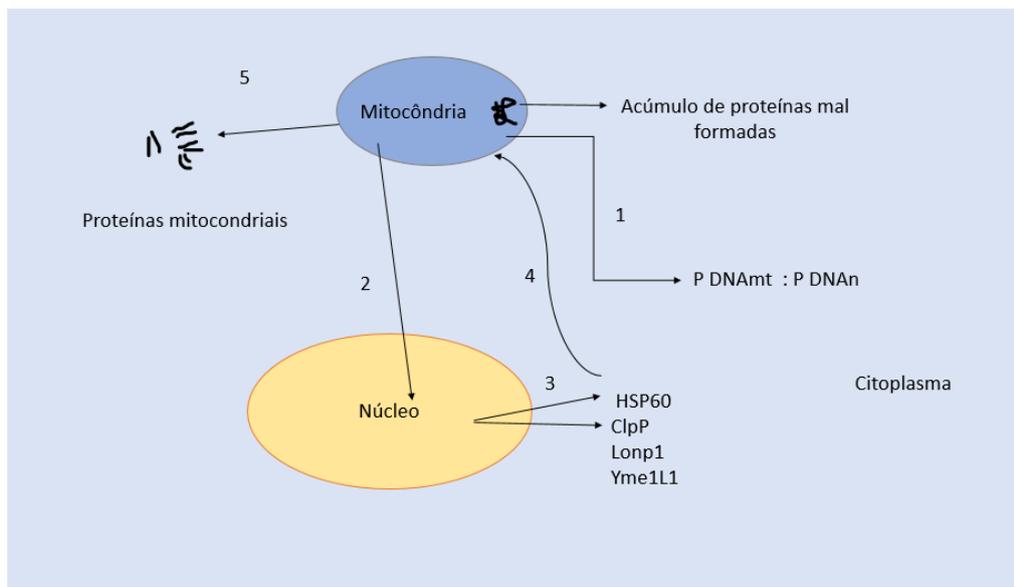


Figura 1. Desenho esquemático sintetizado da ativação da UPRmt e do desequilíbrio mitonuclear. 1- o desequilíbrio mitonuclear é causado por meio da alteração do equilíbrio estequiométrico entre proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial (DNAm) e das proteínas da cadeia transportadora de elétrons advindas do DNA nuclear (DNAn). 2- o amontoado de proteínas mal formadas desencadeia a sinalização de fatores de transcrição do núcleo. 3- transcrição de chaperonas e proteostases 4- as chaperonas e proteostases são direcionadas para auxiliar na remodelação das proteínas mal formadas. 5- proteínas mitocondriais funcionais são formadas, auxiliando na melhora da função mitocondrial.

Viabilidade dos estudos sobre a UPRmt no cenário do exercício físico

Conforme estabelecido na literatura, sabe-se que o exercício físico age como um agente terapêutico, ou ainda, é um método não-farmacológico bastante eficaz tanto para a prevenção, como para o tratamento da obesidade. Porém, os efeitos do exercício físico sobre a UPRmt não são totalmente conhecidos. Recentemente, um estudo demonstrou que o exercício físico altera a proteostase mitocondrial, induzindo o desequilíbrio mitonuclear e UPRmt no hipotálamo de camundongos (7). As modificações do equilíbrio mitocondrial foram acompanhadas pela redução de peso corporal e da ingestão energética. Ademais, constatou-se uma conexão a melhora do metabolismo mitocondrial hipotalâmico e a perda de peso induzida pelo exercício em camundongos (7).

Perante o exposto, acreditamos que o exercício físico seja capaz de causar um estresse fisiológico, estimulando a UPRmt no tecido adiposo de camundongos obesos e, conseqüentemente, auxiliando na melhora da homeostase mitocondrial e celular. Portanto, espera-se que o exercício físico melhore o funcionamento da mitocôndria, e conseqüentemente uma melhora oxidativa.

METODOLOGIA:

Objetivos

- Avaliar o impacto do treinamento físico aeróbio sobre a UPRmt no tecido adiposo de camundongos obesos.
- Avaliar o conteúdo das proteínas ClpP, Hsp60, Yme1L1 e Lonp1, conhecidos marcadores da UPRmt, no tecido adiposo de camundongos Swiss magros e obesos;
- Avaliar o conteúdo das proteínas ClpP, Hsp60, Yme1L1 e Lonp1, conhecidos marcadores da UPRmt, no tecido adiposo de camundongos Swiss obesos após 4 semanas de treinamento físico em esteira;
- Avaliar os componentes da cadeia transportadora de elétrons (ATP5a, Uqcrc2, MTCO1, SDHB e NDUF8b), no tecido adiposo de camundongos Swiss obesos após 4 semanas de treinamento físico em esteira.

Materiais e métodos

Reagentes e anticorpos

Os reagentes e os aparelhos utilizados para o gel Sódio Dodecil Sulfato (SDS- PAGE) serão provenientes da Bio-Rad (Richmond, CA). Os compostos Tris Hidroximetil Aminometano (TRIS), Fenilmetil Sulfonil Fluorido (PMSF), Aprotinina e Ditioneitol (DTT) serão provenientes da empresa Sigma ChemicalCo. (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2µm) será proveniente da empresa Biorad. Serão utilizados os anticorpos anti-OXPHOS (coquetel de subunidades mitocondriais), que será proveniente da empresa ABCAM; anti-ClpP proveniente da empresa ABCAM, anti-Hsp60, anti-Yme1L1 e anti-Lonp1 proveniente da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Animais

Serão utilizados camundongos Swiss machos, com 2 meses de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais serão previamente pesados e alocados em gaiolas individuais, expostos a ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, com temperatura entre 20°C e 22°C, onde receberão água e ração padrão para roedores (da marca Nuvilab) *ad libitum*, ou dieta hiperlipídica por 8 semanas, conforme descrito¹¹. O projeto já foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da UNICAMP. Número do comitê de ética: 5890-1/2021.

Protocolo de Exercício Físico

Para o protocolo de exercício, os camundongos do grupo Exercício serão submetidos a quatro semanas de treinamento em esteira ergométrica, exercitados em intensidade correspondente à máxima fase estável de lactato, conforme proposto por Ferreira e colaboradores¹². Previamente, os camundongos serão adaptados ao ergômetro, visando minimizar o possível estresse induzido pelo equipamento.

Procedimentos de extração

Serão extraídas amostras do tecido adiposo epididimal, mesentérico, retroperitoneal, no entanto, somente o BAT e o epididimal serão posteriormente homogeneizados em tampão de extração (contendo 1% de Triton X 100, 100 mM de Tris - pH 7,4, 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C, reagentes da marca Sigma-Aldrich). Após os experimentos, os animais serão sacrificados por aprofundamento de anestesia, seguido de deslocamento cervical. O homogenato será centrifugado a 11.000 RPM por 30 minutos. Será determinada a concentração de proteína na porção sobrenadante da amostra, utilizando o método de Bradford. Em seguida, será acrescido o tampão de Laemmli a cada uma

das amostras, que serão fervidas por 5 minutos e armazenadas a -80° C para as análises de Western blotting.

Análise protéica por Western blotting

As amostras serão tratadas com tampão de Laemmli¹³ contendo DTT 100 mM (Sigma-Aldrich) e aquecidas em água fervente por 5 minutos. Em seguida, serão aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) no aparelho para minigel (MiniProtean®). A separação das proteínas acontecerá com aumento gradual da voltagem do equipamento com início em 30 Volts até atingir o valor máximo de 120 Volts, como descrito por Towbin et al.¹⁴. Será utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores pré-estabelecidos conforme indicação do fabricante. A transferência das proteínas do gel será feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se cubas de eletroforese da empresa Bio-Rad. Essa etapa terá a duração de aproximadamente 2 horas. As membranas contendo as proteínas e o marcador de peso molecular, serão incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris 10mM, NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,02%) por 2 horas, reduzindo assim as possíveis ligações inespecíficas do anticorpo na membrana de nitrocelulose. As membranas serão posteriormente lavadas e incubadas com anticorpo primário, seguindo as diluições conforme sugestão do fabricante, por 12 horas (overnight) a 4°C. Em seguida as membranas serão lavadas e incubadas com 2 µL de anticorpo secundário por 120 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente lavadas e incubadas com 2 mL de solução de quimioluminescência (Pierce, CA). A reação do anticorpo secundário com a solução quimioluminescente será detectada por meio de um fotodocumentador. A intensidade das bandas será quantificada por densitometria óptica através do programa Uniscan®.

Análise Estatística

Os dados serão analisados através do teste t de Student ou análise de variância (ANOVA), seguida por análise de significância (Bonferroni), quando apropriado, para comparação dos grupos experimentais. A significância estatística adotada será de $p < 0,05$. O processamento e análise dos dados será feita com o auxílio do software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Posto que a ingestão em excesso de gordura saturada e a inatividade física possuem um forte vínculo com a obesidade, levando ao aumento da adiposidade e disfunção mitocondrial nos adipócitos, levantamos a hipótese de que o exercício físico possa ser um ativador fisiológico da UPRmt (*Unfolded Protein Response*), e conseqüentemente, melhorar a proteostase e a atividade mitocondrial, ou ainda, na oxidação de gorduras do tecido adiposo de camundongos obesos.

BIBLIOGRAFIA

1. OBESITY and Overweight: Key facts. Key facts. 2021. World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 09 jun. 2021.
2. Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA & Smith SR. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* **54** 1926–1933 (2005).
3. Cao, S. S. & Kaufman, R. J. Unfolded protein response. *Current biology* : **CB 22**, (2012).
4. Yoneda, T. *et al.* Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *Journal of cell science* **117**, 4055–4066 (2004).
5. Aldridge, J. E., Horibe, T. & Hoogenraad, N. J. Discovery of Genes Activated by the Mitochondrial Unfolded Protein Response (mtUPR) and Cognate Promoter Elements. *PLOS ONE* **2**, e874 (2007).

6. Wu G, Xiong Q, Wei X, Wang Y, Hu X, He G, Liu L, Lai Q, Dai Z, Anushesh D, Xu Y. Mitochondrial unfolded protein response gene CLPP changes mitochondrial dynamics and affects mitochondrial function. *PeerJ* 7:e7209 (2019).
7. Braga, R.R., Crisol, B.M., Brícola, R.S. *et al.* Exercise alters the mitochondrial proteostasis and induces the mitonuclear imbalance and UPRmt in the hypothalamus of mice. *Sci Rep* **11**, 3813 (2021).
8. Rugarli, E. I. & Langer, T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *The EMBO Journal* **31**, 1336 (2012).
9. Friedman, J. R. & Nunnari, J. Mitochondrial form and function. *Nature* **505**, 335–343 (2014).
10. Fischer, F., Hamann, A. & Osiewacz, H. D. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends in biochemical sciences* **37**, 284–292 (2012).
11. Marinho, R. *et al.* Endurance training prevents inflammation and apoptosis in hypothalamic neurons of obese mice. *Journal of cellular physiology* **234**, 880–890 (2018).
12. Ferreira, J. C. B. *et al.* Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **34**, 760–765 (2007).
13. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970 227:5259 **227**, 680–685 (1970).
14. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350–4354 (1979).