



## Estudo dos Efeitos da Poluição Atmosférica na Sinalização da Leptina em Camundongos Alimentados com Dieta Ultraprocessada por 5 ou 30 dias

**Palavras-Chave:** Poluição Atmosférica; MP<sub>2,5</sub>; Obesidade; Dieta Cafeteria; Leptina.

Bianca Camilo Schimenes<sup>1</sup>  
Clara Machado Campolim<sup>2,3</sup>  
Prof. Dr. Mario Abdalla Saad<sup>2</sup>  
Prof. Dr. Young-Bum Kim<sup>3</sup>  
Dra. Mariana Matera Veras<sup>4</sup>  
Prof. Dra. Patricia Oliveira Prada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Investigação Molecular em Obesidade, Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

<sup>2</sup>Departamento de Clínica médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas

<sup>3</sup>Departamento de Medicina, Beth Israel Medical Center, Harvard Medical School

<sup>4</sup>Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

### INTRODUÇÃO:

Atualmente, a maior causa ambiental de doenças e mortes prematuras no mundo é a poluição atmosférica, considerada um grande problema de saúde pública global<sup>1</sup>. Os efeitos da poluição sobre a saúde do ser humano ainda são pouco conhecidos, porém, muitos estudos têm observado uma relação significativa entre a exposição crônica ao material particulado com diâmetro  $\leq 2,5\mu\text{m}$  (MP<sub>2,5</sub>) e a incidência de doenças metabólicas, como obesidade<sup>6</sup> e diabetes *mellitus* tipo 2<sup>2</sup>.

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura e se dá em um estado de inflamação subclínica, sendo considerada fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas<sup>3</sup>. Esse acúmulo de gordura se dá, em geral, pelo desequilíbrio entre o gasto energético e a ingestão alimentar, sendo que, evidências recentes têm apontado que essa relação é comandada, involuntariamente, pelo sistema nervoso central (SNC)<sup>4</sup>. O hipotálamo é responsável pelo controle do balanço energético corporal através da integração entre sinais hormonais, neurais e metabólicos. Um potente hormônio envolvido nessa sinalização é a leptina, sendo que os neurônios que expressam o receptor de isoforma longa da leptina (LepR) nos núcleos hipotalâmicos têm um papel crucial na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético, estimulando a saciedade e o aumento do gasto energético.<sup>4</sup>

Recentemente, nosso grupo demonstrou que apenas 5 dias de exposição ao MP<sub>2,5</sub> foi capaz de aumentar marcadores inflamatórios no hipotálamo de camundongos C57BL/6J e após 3 meses foi instaurada inflamação hipotalâmica e resistência à leptina. Isso pode estar associado ao fato de que o MP<sub>2,5</sub> é composto por lipopolissacarídeos (LPS), um dos principais agonistas do Toll Like Receptor 4 (TLR4), receptor da imunidade inata capaz de promover a transcrição de genes pró-inflamatórios e da SOCS3, uma inibidora fisiológica da via da leptina.<sup>6</sup> Em 1976, os pesquisadores Sclafani e Springer adotaram uma nova dieta em seus estudos, a qual nomearam de dieta cafeteria. Essa dieta consiste no acesso ilimitado de alimentos altamente palatáveis, ultraprocessados e ricos em gordura, sal e açúcar para animais de laboratório, dentro de

um contexto de pesquisa. Dessa forma, a dieta cafeteria reflete o sistema alimentar atual, sendo um indutor de alterações metabólicas.<sup>5</sup>

No último trabalho, nós investigamos os impactos do MP<sub>2,5</sub> sobre metabolismo energético e se a via do TLR4 poderia estar envolvida em tais efeitos. Os camundongos receberam apenas dieta padrão.<sup>6</sup> No presente estudo, nós buscamos ilustrar se esses animais poderiam apresentar um pior fenótipo se a exposição ao MP<sub>2,5</sub> fosse feita combinada com a dieta cafeteria.

## METODOLOGIA:

**Utilização de animais de experimentação:** Camundongos da linhagem C57BL/J com 5 semanas de idade foram obtidos no CEMIB da UNICAMP. Protocolo CEUA/UNICAMP n°5916-1.

**Exposição ao MP<sub>2,5</sub>/Ar Filtrado:** O equipamento utilizado para expor os animais ao MP<sub>2,5</sub>/ar filtrado (AF) foi o Harvard Ambient Fine Particles Concentrator, pertencente e instalado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os grupos experimentais foram levados à câmara de MP<sub>2,5</sub> ou de ar filtrado durante 5 dias e 1 mês.

**Exposição à dieta cafeteria:** Durante o mesmo período de exposição ao MP<sub>2,5</sub>/ar filtrado, os animais receberam dieta cafeteria. Os camundongos receberam um pellet por caixa, junto a um pedaço de bolo industrializado simples sabor abacaxi, salgadinho industrializado e refrigerante sem gás no lugar da água.

**Grupo experimental:** Os camundongos foram divididos em 4 grupos de acordo com a intervenção que receberam (dieta/exposição) como ilustrado na **Figura 1**.



**Figura 1.** Grupos alvo da intervenção.

**Sensibilidade hipotalâmica à leptina:** Os animais foram deixados em jejum overnight, a reposição da dieta foi pesada e às 8:00 receberam uma injeção de salina ou leptina (dose: 3mg/kg de peso). A ingestão alimentar foi mensurada após 1, 2, 4, 8 e 24 horas.

**Análise da massa adiposa:** O tecido adiposo epididimal foi removido imediatamente após o sacrifício dos animais e pesado para verificar o acúmulo de gordura. O resultado é expresso em miligramas de tecido adiposo por grama de peso corporal.

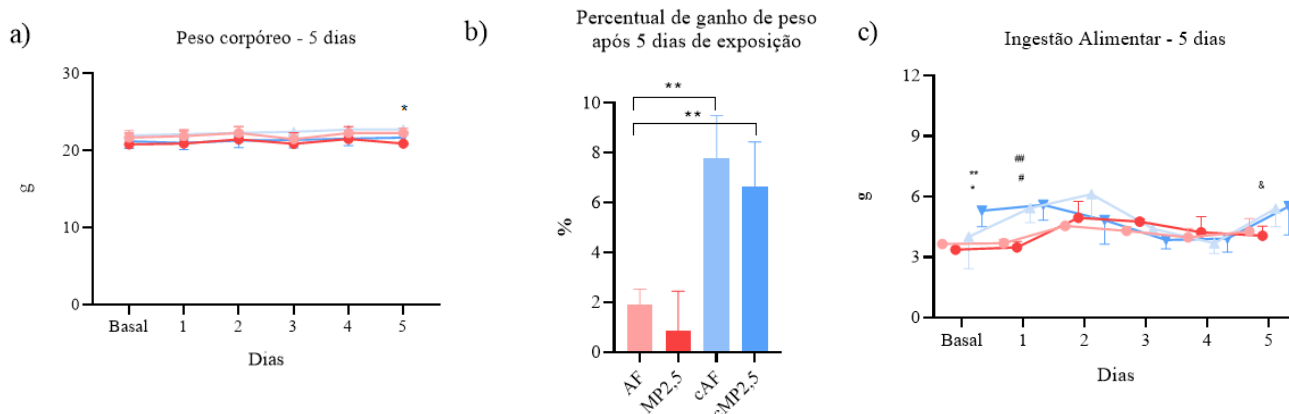
**Análise dos resultados:** A análise estatística foi realizada com a aplicação do one ou two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ), comparando sempre o subgrupo experimental exposto ao ar filtrado ou MP<sub>2,5</sub> com o seu respectivo grupo controle. Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média.

## RESULTADOS:

### Exposição progressiva ao MP<sub>2,5</sub> combinado à dieta cafeteria pode promover ganho de peso

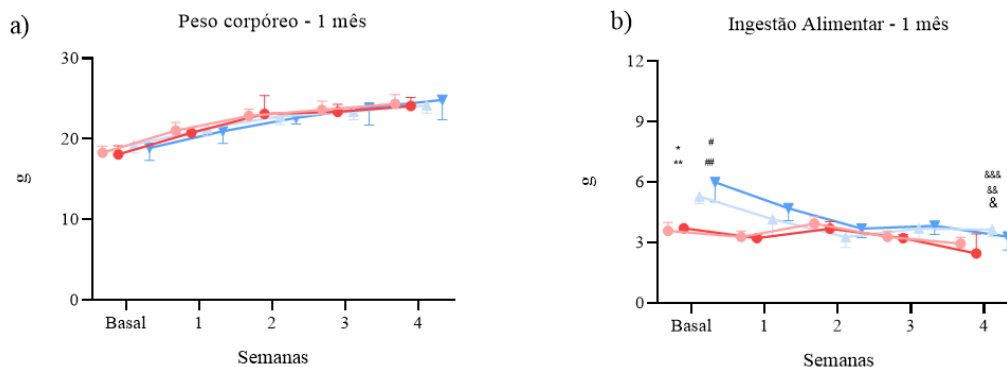
Durante a exposição de 5 dias (**Figura 2. a e b**), percebemos que a poluição por si só não foi capaz de induzir alterações no peso e na ingestão alimentar. Porém, os animais submetidos à dieta cafeteria apresentaram maior ganho de peso em comparação ao grupo que recebia dieta padrão, esse ganho de peso no entanto não diferiu em relação à exposição ao MP<sub>2,5</sub>. Em relação a ingestão alimentar, o grupo cafeteria tem seu consumo aumentado no primeiro contato com a dieta, consumo

este que é normalizado nos dias posteriores. Apenas no quinto dia de exposição, observamos uma diferença entre cMP<sub>2,5</sub> e o MP<sub>2,5</sub> (Figura 2. c).



**Figura 2. Alterações metabólicas desencadeadas pela combinação entre a exposição ao MP<sub>2,5</sub> e a dieta cafeteria por 5 dias.** a) Peso corpóreo em gramas ao longo dos 5 dias de exposição ao MP<sub>2,5</sub> ou AF (n= 6 por grupo); b) Percentual de ganho de peso após 5 dias de exposição ao MP<sub>2,5</sub> ou AF (n=10 por grupo); c) Ingestão alimentar durante os 5 dias de exposição (n=6 grupo). A análise estatística foi realizada pelo Two-way ANOVA em A e C e ordinary One-way ANOVA em B e foi considerado p<0,05. A: \*p=0,0161 MP<sub>2,5</sub> vs. cFA; B: \*\*p<0,0001 AF vs. cAF, AF vs. cMP<sub>2,5</sub>, MP<sub>2,5</sub> vs. cAF, MP<sub>2,5</sub> vs. cMP<sub>2,5</sub>; C: \*p= 0,0084 AF vs. cMP<sub>2,5</sub>; \*\*p= 0,0007 MP<sub>2,5</sub> vs. cMP<sub>2,5</sub>; #p= 0,0001 MP<sub>2,5</sub> vs cMP<sub>2,5</sub>;##p=0,0011 MP<sub>2,5</sub> vs. cAF; AF vs. MP<sub>2,5</sub>; &p= 0,0376 MP<sub>2,5</sub> vs. cMP<sub>2,5</sub>.

Durante a exposição de 1 mês, o peso corpóreo não diferiu significativamente entre os grupos, mesmo com a ingestão de uma dieta mais calórica (Figura 3. a). O primeiro contato com a dieta cafeteria também produziu um consumo aumentado no início da intervenção de um mês, que teve o consumo normalizado até a quarta semana, quando o grupo cafeteria passou a apresentar um consumo significativamente superior ao grupo DP. No entanto, o consumo alimentar não foi diferente entre animais que recebiam a mesma dieta, indicando que a poluição não interferiu no consumo alimentar desses animais. (Figura 3. b)

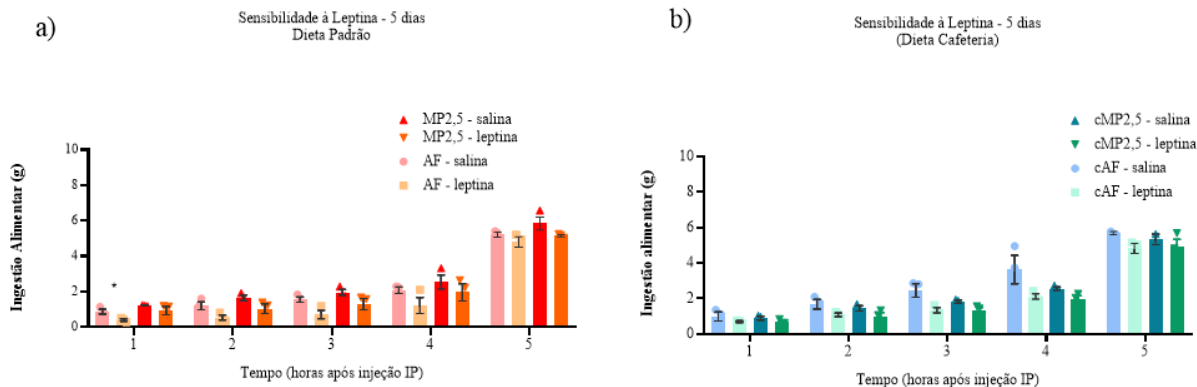


**Figura 3. Perfil de animais expostos por 1 mês ao MP<sub>2,5</sub> e a dieta cafeteria.** a) Peso corpóreo em gramas ao longo das 4 semanas de exposição ao MP<sub>2,5</sub> ou AF (n= 8 por grupo); b) Ingestão alimentar durante os 5 dias de exposição (n=8 grupo). A análise estatística foi realizada pelo Two-way ANOVA em A e B e foi considerado p<0,05. B: \*\*p<0,0001 AF vs. cAF, AF vs. cMP<sub>2,5</sub>, MP<sub>2,5</sub> vs. cAF, MP<sub>2,5</sub> vs. cMP<sub>2,5</sub>; \*p= 0,0038 cMP<sub>2,5</sub> vs. cAF; #p< 0,0001 AF vs cMP<sub>2,5</sub>, MP<sub>2,5</sub> vs. cMP<sub>2,5</sub>; ##p=0,0048 MP<sub>2,5</sub> vs. cAF; AF vs. cAF; &p= 0,0089 MP<sub>2,5</sub> vs. cMP<sub>2,5</sub>; &&p=0,421 AF vs. cAF; &&&p<0,0001 MP<sub>2,5</sub> vs. cFA.

### A exposição aguda ao MP<sub>2,5</sub> pode levar a resistência à leptina

Apesar dos animais não apresentarem hiperfagia e ganho de peso significativo ocasionado pela exposição ao material particulado, 5 dias de exposição foram suficientes para alterar a ingestão alimentar em resposta a injeção intraperitoneal de leptina. Apenas o grupo AF respondeu a ação do

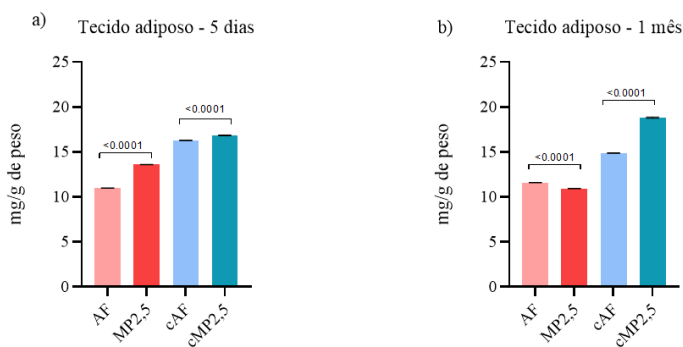
hormônio (**Figura 4. a**), reduzindo o consumo alimentar após a administração da leptina. Os demais grupos se alimentaram normalmente, sugerindo uma resistência na via de sinalização da leptina. Entre os animais que consumiam dieta cafeteria, com 5 dias todos os grupos apresentaram baixa resposta a injeção do hormônio (**Figura 4. b**).



**Figura 4. Sensibilidade à leptina após 5 dias de exposição ao MP<sub>2,5</sub> ou ar filtrado.** a) Ingestão alimentar dos animais em dieta padrão durante o teste de sensibilidade à leptina (n= 3 animais em cada grupo); b) Ingestão alimentar dos animais em dieta cafeteria durante o teste de sensibilidade à leptina (n=3 animais em cada grupo). A análise estatística foi realizada pelo Two-way ANOVA com teste t não pareado em A e B e foi considerado p<0,05. A: \*p= 0.0347.

### Exposição ao MP<sub>2,5</sub> alterou a composição corporal

A exposição de 5 dias ao MP<sub>2,5</sub> contribuiu com o aumento de tecido adiposo tanto no grupo que recebeu a dieta cafeteria quanto no que recebeu a dieta padrão, o ganho de massa adiposa é ainda maior quando a poluição é combinada com a dieta cafeteria. (**Figura 5. a**). 1 mês de exposição também mostrou ser suficiente para aumentar a massa de tecido adiposo no grupo cMP<sub>2,5</sub>. Ao longo desse um mês, o grupo MP<sub>2,5</sub> desenvolveu um método para compensar o ganho de gordura em resposta à exposição. (**Figura 5. b**).



**Figura 5. Composição corporal de animais expostos por 5 dias e 1 mês ao MP<sub>2,5</sub> e a dieta cafeteria.** a) Peso de tecido adiposo epididimal em miligramas por grama de peso corporal ao longo dos 5 dias de exposição ao MP<sub>2,5</sub> ou AF (n= 4-6 por grupo); b) Peso de tecido adiposo epididimal em miligramas por grama de peso corporal ao longo das 4 semanas de exposição ao MP<sub>2,5</sub> ou AF (n= 8 por grupo).

### DISCUSSÃO:

A exposição de 5 dias ao MP<sub>2,5</sub> não foi capaz de induzir alterações no peso e na ingestão alimentar, sendo que esta só mostrou diferença no quinto dia de exposição. Porém, os animais submetidos à dieta cafeteria apresentaram maior ganho de peso em comparação ao grupo que recebia

dieta padrão, o que era esperado, visto que outros estudos demonstraram esse ganho de peso prematuro<sup>7</sup>. Entretanto, após os 5 dias houve um aumento significativamente maior no tecido adiposo dos animais expostos ao MP<sub>2,5</sub> em relação a seus controles filtrados, ambos em dieta padrão, mesmo sem apresentar hiperfagia e ganho de peso.

Ainda, esse curto período de exposição nos trouxe um resultado inédito: 5 dias de exposição ao MP<sub>2,5</sub> foram suficientes para alterar a ingestão alimentar em resposta a injeção intraperitoneal de leptina, o que sugere uma resistência na via de sinalização da leptina e, possivelmente inflamação hipotalâmica. Estudos já mostraram que a dieta cafeteria é capaz de induzir resistência à leptina após duas semanas de sua administração<sup>8</sup>. Nossos resultados sugerem ainda que a resistência à leptina pode ser instaurada em camundongos jovens com apenas 5 dias de administração.

Os achados de ingestão alimentar e ganho de peso nos animais expostos durante 1 mês à poluição nos trazem uma inconsistência, pois, mesmo com um consumo alimentar superior, o grupo submetido à dieta cafeteria manteve um ganho de peso inferior aos animais que receberam a dieta padrão, podendo ter ocorrido um mecanismo compensatório do organismo em resposta ao aumento da ingestão calórica. No entanto, a poluição foi suficiente para atenuar tal mecanismo por volta da 4ª semana de exposição e aumentar o ganho de peso do grupo cMP<sub>2,5</sub> em comparação ao cAF. Indo de encontro com os nossos achados na exposição de 3 meses (estudo anterior do nosso grupo), nos quais os camundongos apresentaram hiperfagia, ganho de peso e aumento da ingestão alimentar induzidos pelo MP<sub>2,5</sub><sup>6</sup>. O aumento do tecido adiposo no grupo cMP<sub>2,5</sub> foi maior, mas não diferiu entre os animais que receberam a dieta padrão. No entanto, no nosso estudo anterior, em uma exposição de longo prazo, 3 meses, os animais expostos ao MP<sub>2,5</sub> mantiveram o tecido adiposo elevado em comparação com os seus controles, sugerindo que talvez o nosso número de animais nesse grupo possa ser uma limitação do presente resultado.

## CONCLUSÃO:

Os resultados acima demonstram que a poluição atmosférica pode interferir prematuramente na ação da leptina, no entanto análises ainda precisam ser feitas para aprofundar essa investigação. A partir disso, a dieta cafeteria representa outro importante fator ambiental capaz de exacerbar os efeitos da poluição atmosférica sobre as alterações no metabolismo energético.

## BIBLIOGRAFIA

1. LANDRIGAN, P. J. et al. **The Lancet Commission on pollution and health**. The Lancet. 2017.
2. PEARSON J. F. et al. **Association between fine particulate matter and diabetes prevalence in the U.S.** *Diabetes Care*. 2010.
3. WANNMACHER, L. **Obesidade como fator de risco para morbidade: evidências sobre o manejo com medidas não medicamentosas**. *OPAS/OMS*. 2016.
4. PAN W. W. et al. **Leptin and the maintenance of elevated body weight**. *Nat Rev Neurosci*. 2018.
5. LALANZA, J.F. et al. **The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior**. *Neurosci Biobehav Rev*. 2021.
6. CAMPOLIM, C.M. et al. **Short-term exposure to air pollution (PM2.5) induces hypothalamic inflammation, and long-term leads to leptin resistance and obesity via Tlr4/Ikbke in mice**. *Sci Rep*. 2020.
7. HALL, K. D. et al. **Ultra-processed diets cause excess calorie intake and weight gain: an inpatient randomized controlled trial of ad libitum food intake**. *Cell Metab.*, 30 (2019).
8. MULLER-FIELITZ, H. et al, **Leptin sensitivity and AT1 receptor blockade**. *Br J Pharmacol*, 172: 857-868. 2015.