



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

Palavras-Chave: Exercício físico, *UPRmt*, tecido adiposo

Autores/as:

Scylas José de Andrade Junior [UNICAMP]  
Carlos Kiyoshi Katashima, Dr. [UNICAMP]  
Diego Gomes de Melo, Ms. [UNICAMP]  
Matheus Biscaro Rocha [UNICAMP]  
Fernanda Silva Carneiro [UNICAMP]  
Eduardo Rochete Ropelle, Prof. Dr. [UNICAMP]

---

### RESUMO:

A mitocôndria é uma complexa organela responsável pela produção de energia em forma de ATP por intermédio da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Esta organela possui um controle de qualidade extremamente organizado, uma vez que qualquer disfunção desse sistema acarreta o declínio da função celular. Isto é notório em doenças metabólicas como a obesidade, e o diabetes. Esse mecanismo de controle de qualidade mitocondrial é ativado principalmente em condições de estresse metabólico e perda da proteostase mitocondrial, e é conhecido como *UPRmt* (*Unfolded Protein Response*). A ativação da *UPRmt* possibilita a recuperação completa da homeostase mitocondrial e muitas vezes leva a uma melhora da função da organela. Tendo em mente que o exercício físico também é um agente causador de estresse metabólico, e estresse oxidativo, aventamos a hipótese de que o exercício físico aeróbio possa estimular a *UPRmt* e ajude na melhora da função oxidativa das mitocôndrias no tecido adiposo marrom de camundongos obesos.

### METODOLOGIA:

#### Objetivos

- Avaliar o impacto do treinamento físico aeróbio sobre a *UPRmt* no tecido adiposo marrom de camundongos obesos;
- Avaliar o conteúdo das proteínas ClpP, Hsp60, Yme1L1 e Lonp1, conhecidos marcadores da *UPRmt*, no tecido adiposo marrom de camundongos Swiss magros e obesos;
- Avaliar o conteúdo das proteínas ClpP, Hsp60, Yme1L1 e Lonp1, conhecidos marcadores da *UPRmt*, no tecido adiposo marrom 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) são provenientes da empresa Sigma ChemicalCo. (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2µm) é proveniente da empresa Biorad. Foram utilizados anticorpos ABCAM, anti-CipP proveniente da empresa ABCAM, anti-Yme1L1 e anti-Lonp1 proveniente da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

### **Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com 2 meses de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram 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 receberam água e ração padrão para roedores (da marca Nuvilab) *ad libitum*, ou dieta hiperlipídica por 8 semanas, conforme descrito. O projeto 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 foram submetidos a quatro semanas de treinamento em esteira ergométrica, exercitados em intensidade correspondente à máxima fase estável de lactato, conforme proposto por Ferreira e colaboradores (5). Previamente, os camundongos foram adaptados ao ergômetro, visando minimizar o possível estresse induzido pelo equipamento.

### **Procedimentos de extração**

Foram extraídas amostras do tecido adiposo epididimal, mesentérico, retroperitoneal, no entanto, somente o BAT e o epididimal foram 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 foram sacrificados por aprofundamento de anestesia, seguido de deslocamento cervical. O homogenato foi centrifugado a 11.000 RPM por 30 minutos. Foi determinada a concentração de proteína na porção sobrenadante da amostra, utilizando o método de Bradford. Em seguida, foi acrescentado 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 proteica por Western blotting**

As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli 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 aconteceu 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. Foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores pré-estabelecidos conforme indicação do fabricante. A transferência das proteínas do gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se cubas de eletroforese da empresa Bio-Rad. Essa etapa teve a duração de aproximadamente 2 horas. As membranas contendo as proteínas e o marcador de peso molecular, foram 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 foram 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 foram 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

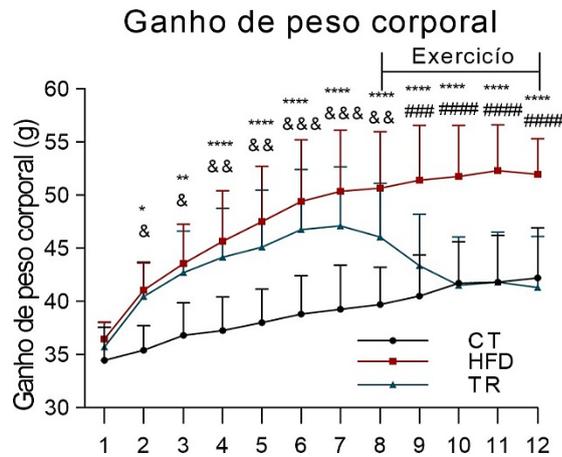
será detectada por meio de um fotodocumentador. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através do programa Uniscan®.

### Análise Estatística

Os dados foram analisados através do “*Test T 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 foi feita com o auxílio do software *GraphPad Prism 8.0* (GraphPad Software, San Diego, CA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

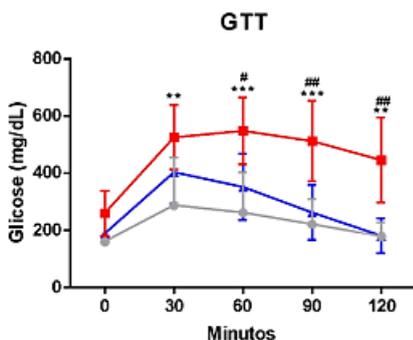
Fig 1. A



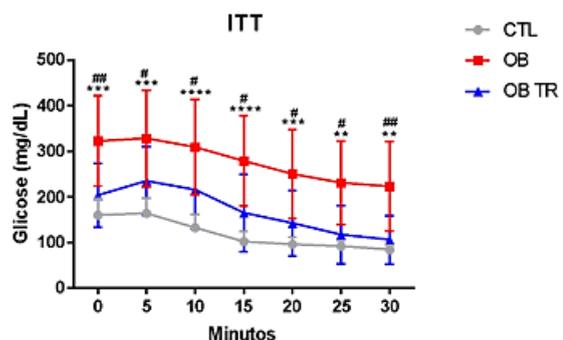
**Figura 1. A)** Ganho de peso Corporal (em gramas) no período de 12 semanas. Os símbolos estatísticos representam diferença estatística entre: “\*”: CTL vs HFD; “&”: CTL vs TR; “#”: HFD vs TR. “\*” = valor p de 0.01 até 0.05, “\*\*” = valor p de 0.001 até 0.01, “\*\*\*” = valor p de 0.0001 até 0.001 e “\*\*\*\*” = valor p.

Na **Figura 1 A**, observa-se que o peso dos animais dos grupos HFD e TR teve um aumento maior em comparação ao grupo CTL. No entanto, com o início do protocolo de exercício o grupo TR teve uma diminuição do peso, indicando que o exercício físico induziu um efeito protetor no quadro de obesidade.

Fig. 2 A.



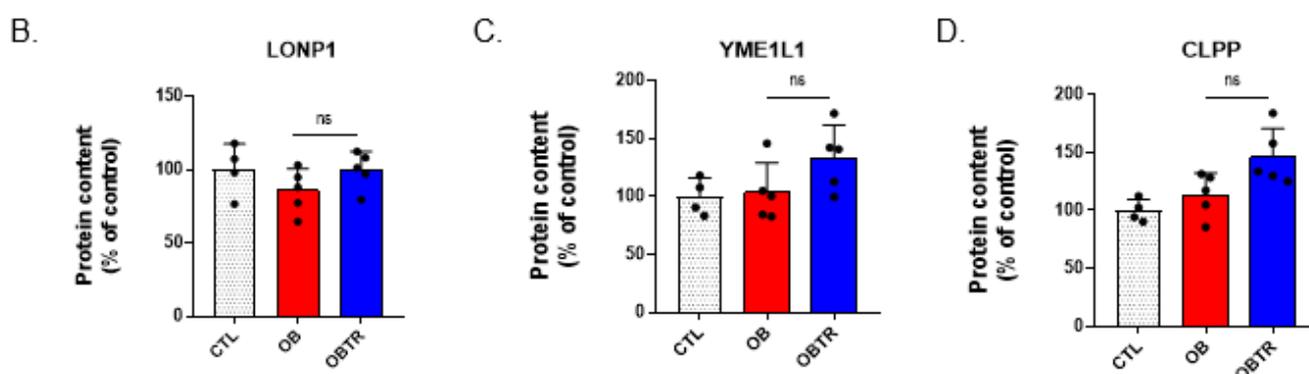
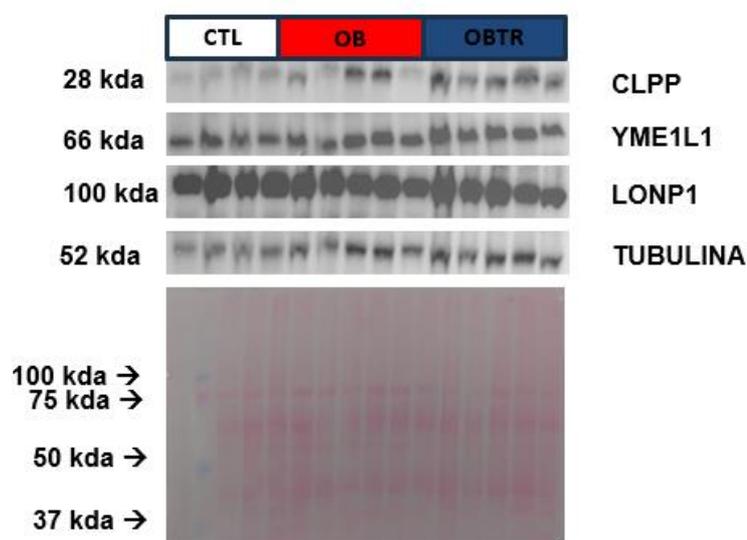
B.



**Figura 2 – A.** Curva glicêmica durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT). **B.** Curva Glicêmica duranteo Teste de Tolerância à Insulina (ITT). Teste Anova Two-Way. Os símbolos representam estatísticas significativas quando: \* CTL versus OB  $p < 0,05$ , \*\* CTL versus OB  $p < 0,005$ , \*\*\* CTL versus OB  $p < 0,0005$ , \*\*\*\* CTL versus OB  $p < 0,00005$ ; # OB versus OB TR  $p < 0,05$ , ## OB versus OB TR  $p < 0,005$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).

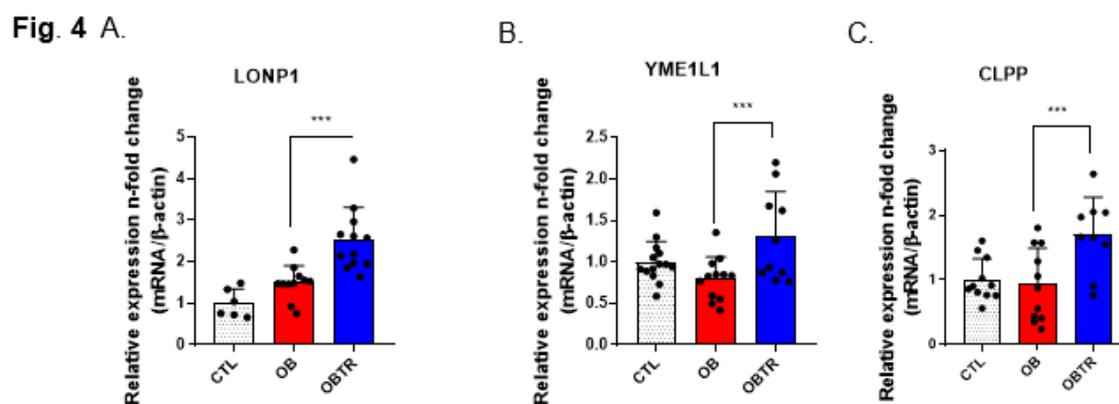
Após o protocolo de exercício físico, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT) e ao teste de tolerância à insulina (ITT). Na figura 2, observa-se que tanto no ITT, quanto no GTT, houve uma redução da glicemia no grupo treinado (OB/HFD+TR) em relação ao grupo obeso (OB/HFD). Percebe-se que diferem também o grupo obeso (OB/HFD) e o grupo controle (CTL). Sendo assim, o exercício também foi capaz de curar o cenário de tolerância a glicose e da insulina.

**Fig. 3 A.**



**Fig.3** Efeito do exercício físico sobre marcadores da UPRmt no tecido adiposo marrom de camundongos obesos. (A-B-C) Conteúdo proteico da LONP1, Yme1L1 e da CLPP. (n=4-5). ns =  $p > 0,05$

Analisando parâmetros moleculares como o conteúdo de proteínas relacionadas ao mecanismo de *UPRmt* no tecido adiposo marrom (BAT) dos camundongos por meio da realização da técnica de *Western Blotting* no tecido, não foi identificada diferença estatística significativa entre o grupo OB e o grupo OBTR, apesar de existir uma tendência do grupo OBTR apresentar conteúdo proteico maior em comparação ao grupo OB. Sendo assim, buscamos averiguar se houve um aumento da expressão dos genes que codificam as proteínas da *UPRmt* no tecido adiposo marrom (BAT) através da técnica de *RT-PCR* (Fig. 4). Observamos um maior aumento da expressão gênica no grupo OBTR em relação ao grupo OB, indicando que o protocolo de exercício físico foi capaz de promover genes da *UPRmt*.



**Fig.3** Efeito do exercício físico sobre marcadores da *UPRmt* no tecido adiposo marrom de camundongos obesos. (A-B-C). Expressão gênica da *LONP1*, *Yme1L1* e da *CLPP*. (n=4-5). \*\*\* =  $p < 0.05$ .

Mediante os resultados apresentados, podemos concluir que o exercício físico foi capaz de desencadear a *UPRmt* no tecido adiposo marrom dos camundongos obesos, estabelecendo uma relação com o metabolismo mitocondrial, e que também o exercício foi eficaz no tratamento da fisiologia geral de animais com deficiências associadas ao consumo de dieta hiperlipídica. Não observamos o aumento de marcadores da *UPRmt* no tecido adiposo marrom dos camundongos obesos. No entanto, observamos um aumento da expressão dos genes que codificam os marcadores da *UPRmt*. Portanto, com esses resultados podemos concluir que o exercício físico é uma excelente estratégia não-farmacológica no tratamento e/ou prevenção da obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e outras doenças metabólicas associadas, tendo em vista a eficácia do protocolo de treinamento utilizada em reduzir os efeitos secundários da obesidade, como o peso corporal, aumento da sensibilidade a insulina e glicose.

## 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. 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).
4. Marinho, R. *et al.* Endurance training prevents inflammation and apoptosis in hypothalamic neurons of obese mice. *Journal of cellular physiology* **234**, 880–890 (2018).
5. 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).
6. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **190**:5259 **227**, 680–685 (1970).
7. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamidegels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350–4354 (1979).