



Avaliação Metabólica de Camundongos com *ChREBP* Nocauteado Especificamente em Adipócitos

Palavras-Chave: Restrição Calórica, Lipogênese *de novo*, Adipócitos

Autores(as):

Vinícius Franco de Freitas, IB – UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori, IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A lipogênese *de novo* é uma ação metabólica que sintetiza lipídeos a partir de substratos não lipídicos (como carboidratos) tendo principal efeito no tecido adiposo e no fígado (órgãos responsáveis pela reserva e manutenção dos estoques de energia do corpo) e apresenta papel minoritário na regulação de triglicérides da homeostase por conta de a obtenção dessas moléculas ocorrer em grande parte através da alimentação. Entretanto, a desregulação dessa via está constantemente associada a patologias, como obesidade, câncer e infecções virais, além de elevada resistência à insulina que dificulta o metabolismo de glicose (AMEER et. al., 2014).

O tecido adiposo é caracterizado por células responsáveis pelo estoque de gordura corporal, podendo apresentar uma gotícula grande (uniloculadas) ou várias menores (multiloculadas) (HISTOLOGIA INTERATIVA, 2022). Além disso, estudos apontam que a interação do tecido adiposo com outros tecidos e órgãos do corpo auxilia na manutenção do metabolismo e conseqüentemente da homeostasia (THOMOU, et. al., 2017).

O gene *ChREBP* é fator de transcrição expresso principalmente no fígado e no tecido adiposo (dominância no metabolismo lipogênico se comparado a outros fatores de transcrição) (FILHOULAUD, 2013). De acordo com Pongvarin et. al., (2015), *ChREBP* ativa uma grande gama de genes envolvidos em diversas vias de ativação como Sinalização da Insulina e Ciclo de Krebs. Há ainda vias de ativação

específicas do tecido adiposo, como Vias de Sinalização MAPK e Sinalização de Adipocitocinas. Dentre os genes mais ativados por *ChREBP* nesse tecido, vale apontar os genes *FASN*, *ACLY*, *ACACA* que estão regulados positivamente pela restrição calórica.

A restrição calórica é uma alteração na dieta do organismo que proporciona a condição de balanço energético negativo (maior gasto energético do que obtenção) em detrimento de proporcionar outros benefícios, como aumento da longevidade (lifespan), melhora na autofagia celular, diminuição de disfunção vascular, melhora a sensibilidade à insulina, entre outros (GOLBIDI et. al., 2017).

Dados preliminares do laboratório apontam que a restrição calórica resulta em um aumento de genes relacionados à lipogênese *de novo* no tecido adiposo de camundongos (Figura 1). Portanto, foi hipotetizado que o aumento da lipogênese *de novo* proporciona uma manutenção dos estoques de gordura em animais submetidos à restrição alimentar durante longos períodos de tempo. Assim, é provável que o *ChREBP* exerça um papel fundamental em adipócitos para a adaptação metabólica sob dieta de restrição calórica.

O objetivo geral desse trabalho é avaliar o papel da lipogênese *de novo* em camundongos nocauteados para o gene *ChREBP*, especificamente em adipócitos, para compreender as adaptações metabólicas sob os efeitos da restrição calórica.

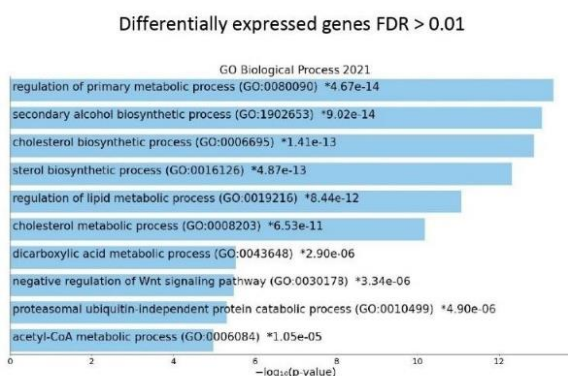


Figura 1: Análise de genes expressos na Restrição Calórica (FDR) com alto grau de significância por enriquecimento, obtidos por análise de RNA-seq. É possível notar que os processos biológicos mostrados à esquerda condizem com processos de lipogênese *de novo*. São exemplos de processos de biossíntese: a alcoólica; de colesterol; de estero. Além da regulação do metabolismo lipídico.

METODOLOGIA:

Camundongos das linhagens Adipoq-Cre são animais transgênicos que expressam a recombinase Cre apenas em adipócitos (WONG, 2021). Portanto, cruzar tais linhagens com camundongos que apresentam alelos com o gene de interesse, flanqueado por dois sítios Lox (como é o caso do *ChREBP* lox/lox), permite o nocauteamento específico do gene nos adipócitos (YANG, 2016).

Camundongos *ChREBP* lox/lox da linhagem C57BL/6 estão sendo cruzados com animais da mesma linhagem que carregam o transgene Adiponectin-Cre a

fim de se obter animais com nocauteamento de *ChREBP* apenas em adipócitos (YANG, 2016; WONG,

2021). Para identificar o sucesso dos cruzamentos os animais estão sendo genotipados. Após selecionados, nas gerações F2 ou F3, animais machos *ChREBP* lox/lox de 3 meses de idade carregando o transgene (*Ad-ChREBP-KO*) ou não (grupo controle) serão submetidos à dieta *ad libitum* ou restrição calórica, com redução de 40% da ingestão alimentar, por 3 meses (REIS et. al., 2016). Dessa forma, os mesmos irão passar por avaliação metabólica e tecidual afim de averiguar os efeitos das intervenções aplicadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram realizadas revisões bibliográficas e preenchimento de formulários para a Comissão de Ética no Uso de Animais para a aquisição dos animais e início das atividades. Um total de 10 animais (animais matrizes ou F0) foram utilizados para a formação de casais no dia 05/01/2023, quando já haviam atingido idade reprodutiva de 8 semanas, sendo: 2 fêmeas *ChREBP* lox/lox; 3 machos *ChREBP* lox/lox; 3 fêmeas Adiponectina Cre; 2 machos Adiponectina Cre.

Os animais cruzaram e passaram pelas etapas de desmame e genotipagem para identificação do genótipo mais adequado para a formação dos próximos casais. Na Figura 2, é possível visualizar o resultado do novo protocolo estabelecido para genotipagem que usa as mesmas temperaturas no termociclador para os genes Adiponectina Cre e *ChREBP*, o que reduziu o tempo de análise pela metade.

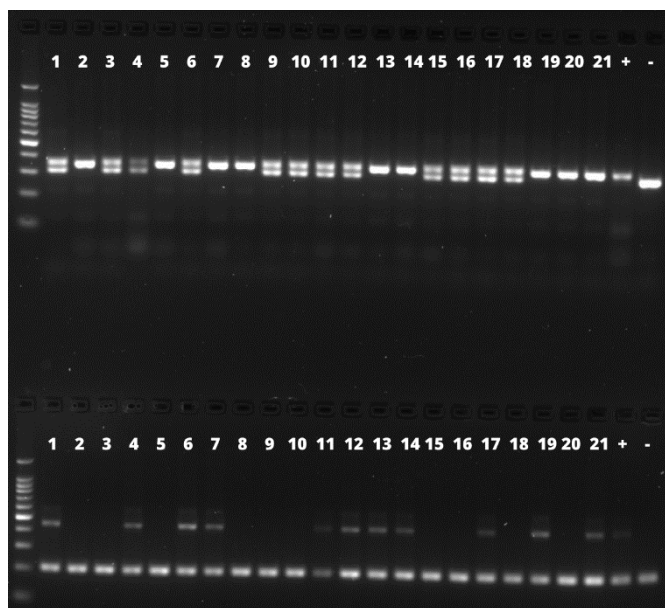


Figura 2: Genotipagem dos animais machos e fêmeas da segunda geração de camundongos (F2). Os animais estão distribuídos intercalados, sendo os quatro primeiros (números de 1 a 4) machos, os três próximos fêmeas (números de 5 a 7), os quatro próximos machos (números de 8 a 11) e assim sucessivamente. Na região superior o gene *ChREBP* é analisado, apresentando os controles positivo (+) e negativo (-) para o flanqueamento com bandas em 350bp e 300bp respectivamente. Na presença de duas bandas o genótipo é heterozigoto (*ChREBP* lox/wild type). Na região inferior o gene Adiponectina Cre é analisado, apresentando os controles positivo (+) e negativo (-) para a recombinase com bandas próximas de 500bp e 200bp para o primeiro e apenas a banda de 200bp para o segundo.

Todos os 5 casais geraram uma prole de 42 filhotes para a primeira geração de animais, dos quais resultaram em 7 machos com o genótipo Adiponectina Cre e *ChREBP* lox/wild type (heterozigoto) para formar o cruzamento da primeira geração com novos animais doados. Até o momento, a segunda geração já gerou mais de 55 animais, dos quais 8 animais (incluindo machos e fêmeas) apresentam o

genótipo Adiponectina Cre e *ChREBP* lox/lox, sendo que os mesmos formaram novas caixas de cruzamento para geração da F3 que será utilizada no projeto.

Para corroborar a pesquisa *in vivo*, foi pensado um modelo *in vitro*. Foi hipotetizado que culturas celulares cultivadas com soro de animais que passaram por restrição calórica iriam expressar as mesmas alterações de expressão gênica que o modelo *in vivo* para a via da lipogênese *de novo*.

As Figuras 3, 4 e 5 apresentam os resultados de PCR para os genes *ChREBP*, *ACC* (responsável por converter Acetil-CoA em Manoilil-CoA) e *FASN* (responsável por converter Manoilil-CoA em Palmitato) de adipócitos brancos tratados com soro de animais submetidos a restrição calórica (RC) e soro de animais tratados com dieta *Ad libitum* (AL), ambos após a diferenciação das células.

Apesar de indicarem que o soro de animais sob restrição calórica influencia na expressão dos genes de células de cultura, os dados ainda não apresentam reprodutibilidade, necessitando de mais experimentos.

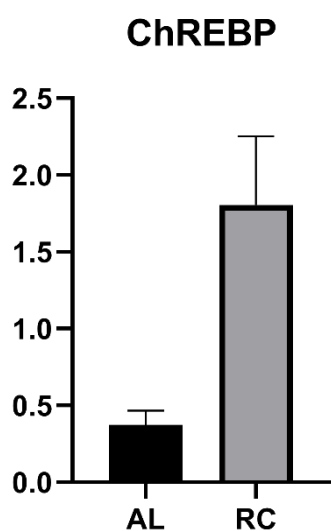


Figura 3: Avaliação do gene *ChREBP* para culturas celulares tratadas com soro Ad libitum e Restrição calórica. Amostras apresentam n = 4 e valor de significância $P < 0,05$.

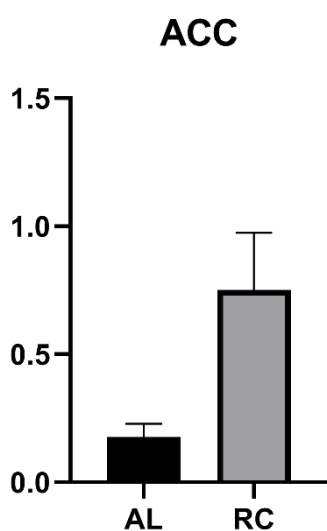


Figura 4: Avaliação do gene *ACC* para culturas celulares tratadas com soro Ad libitum e Restrição calórica. Amostras apresentam n = 4 e valor de significância $P < 0,05$.

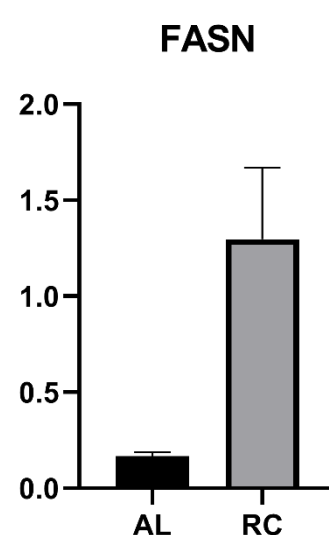


Figura 5: Avaliação do gene *FASN* para culturas celulares tratadas com soro Ad libitum e Restrição calórica. Amostras apresentam valor de n = 4 e valor de significância $P < 0,05$.

CONCLUSÕES:

O processo para obtenção de animais por seleção artificial é demorado, ao qual se faz necessário a criação de novas técnicas de edição gênica e o barateamento das técnicas atuais, como a técnica CRISPR.

É estimado que até o mês de dezembro os animais já tenham começado o protocolo de restrição calórica. Até lá, mais experimentos com cultura de células serão realizados, afim de corroborar com os dados que serão obtidos.

São necessários mais estudos para compreender a importância da via da lipogênese *de novo* para a restrição calórica e como essa interação pode beneficiar o desenvolvimento de novas terapias e estudos para o combate a obesidade, diabetes e promover um envelhecimento saudável para a população.

BIBLIOGRAFIA

- AMEER, F. et. al. **De novo lipogenesis in health and disease.** *Metabolism*, v. 63, n. 7, p. 895- 902, 2014.
- de Cabo R. et. al. **An in vitro model of caloric restriction.** *Exp Gerontol.* 2003 Jun;38(6):631-9. doi: 10.1016/s0531-5565(03)00055-x. PMID: 12814798.
- FILHOULAUD, G. et. al. **Novel insights into ChREBP regulation and function.** *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 24, n. 5, p. 257-268, 2013.
- GOLBIDI, S. et. al. **Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction.** *Curr Diab Rep* **17**, 123 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0951-7>
- HISTOLOGIA INTERATIVA. **Página Institucional.** Universidade Federal de Alfenas, MG. 2022. Disponível em: <<https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/tecido-adiposo/#:~:text=O%20tecido%20adiposo%20%C3%A9%20caracterizado,difere%20nas%20partes%20do%20corpo.>>. Acesso em: 13/05/2022.
- POUNGVARIN, N. et. al. “Genome-Wide Analysis of ChREBP Binding Sites on Male Mouse Liver and White Adipose Chromatin.” *Endocrinology* vol. 156,6 (2015): 1982-94. doi:10.1210/en.2014-1666
- REIS, F. C. G et. al. **Fat-specific Dicer deficiency accelerates aging and mitigates several effects of dietary restriction in mice.** *Aging (Albany NY)*, v. 8, n. 6, p. 1201, 2016.
- THOMOU, T. et. al. **Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues.** *Nature*, v. 542, n. 7642, p. 450-455, 2017.
- WONG, A. M. et. al. **Characterization of the adiponectin promoter+ Cre recombinase insertion in the Tg (Adipoq-cre) 1Evd mouse by targeted locus amplification and droplet digital PCR.** *Adipocyte*, v. 10, n. 1, p. 21-27, 2021.
- YANG, H. et. al. **Adipose-specific deficiency of fumarate hydratase in mice protects against obesity, hepatic steatosis, and insulin resistance.** *Diabetes*, v. 65, n. 11, p. 3396-3409, 2016.