



## **Efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico aeróbio sobre o conteúdo das proteínas de junção no hipotálamo**

**Palavra-chave: Proteínas de junção, hipotálamo, dieta hiperlipídica, exercício aeróbio**

**Autores:**

**Daniel dos Santos Dias [FCA – UNICAMP]**

**Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle (orientador) [FCA – UNICAMP]**

### **RESUMO**

O hipotálamo é considerado o principal regulador da homeostase energética, outros mecanismos podem ter participação no controle da fome como os tanicitos, através das proteínas de junção responsáveis por formar as Tight Junction (TJ) que modulam a entrada de substratos metabólicos no hipotálamo. Já a dieta hiperlipídica e obesidade estimulam expressões de proteínas inibitórias, como prenociceptina (PNOC) que agem no núcleo arqueado e na eminência média inibindo os neurônios POMC anorexígenos, além disso, reduz a sensibilidade à insulina, aumento de permeabilidade ao líquido cefalorraquidiano (LCR), a redução da atividade da leptina e o ganho de peso. Portanto, este estudo tem como objetivo investigar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico aeróbio sobre conteúdo proteico das TJs em camundongos. Desse modo, grupos de camundongos foram induzidos a dieta hiperlipídica e exercício aeróbio e tiveram seus tecidos hipotalâmicos extraídos para análise das proteínas de junção ZO-1, Claudina-1 e Ocludina por Western blotting. O estudo demonstrou que o exercício aeróbio melhorou a sensibilidade a insulina, reduziu ingestão alimentar e o peso corporal. Além disso, a dieta hiperlipídica reduziu a expressão ZO-1, no entanto, o exercício aeróbio recuperou parte da expressão proteica.

### **METODOLOGIA:**

#### **Objetivos**

- Avaliar a evolução do peso corporal e a ingestão alimentar em resposta à dieta hiperlipídica e ao exercício físico
- Investigar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico aeróbio sobre conteúdo proteico de ZO-1, Claudina-1 e Ocludina no hipotálamo de camundongos.

### **MATERIAS E MÉTODOS**

#### **Animais**

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J com 2 meses de idade provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram pré-pesados e colocados em gaiolas de cinco animais cada, expostos a ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro a uma temperatura entre 20°C e 22°C, onde receberam água e ração padrão para roedores do grupo controle (CTL) (da Nuvilab) e ingestão de dieta rica

em gordura saturada (HFD) ad libitum para os grupos *high fat diet* (HFD) e *high fat diet* exercitado (HFD+EXE) por 8 semanas. O projeto foi submetido à avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética da UNICAMP. Registro: 6257-1/2023.

### **Protocolo de Exercício físico**

Após 4 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, os camundongos do grupo HFD+EXE foram treinados em esteira ergométrica por 4 semanas em intensidade correspondente à máxima fase estável do lactato conforme sugerido por Ferreira et al<sup>11</sup>. Previamente, o grupo foi adaptado ao ergômetro para minimizar possíveis estresses induzidos pelo equipamento.

### **Teste de tolerância à insulina (ITT)**

Previamente, foram selecionados aleatoriamente 5 camundongos machos C57BL/6J de cada grupo, sendo CTL, HFD e HFD+EXE e submetidos 4 horas de jejum. Após o jejum, os animais foram pesados e foram coletadas as amostras de sangue no tempo 0 (basal). Em seguida, a insulina (2U/kg de peso corporal) foi injetada no peritônio dos camundongos e as amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para determinar a glicose sérica. Utilizou-se o glicosímetro da marca Accu-Chek para mensurar os níveis séricos de glicose.

### **Reagentes e Anticorpos**

Os reagentes e instrumentação para géis de dodecil sulfato de sódio (SDSPAGE) foram da Bio-Rad (Richmond, CA). Os compostos Tris Hidroximetil Aminometano (TRIS), Fenilmetil Sulfonil Fluorido (PMSF), Aprotinina e Ditiotretol (DTT) foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose utilizada (BA85, 0,2 mm) foi da Biorad. Foram utilizados anticorpos ZO-1 (61-7300) da Invitrogen – Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), anti-Ocludina (N-19), Claudina-1 (A-9) da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA),  $\beta$ -Actina (3700) e  $\beta$ -Actina (4967) da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA).

### **Procedimentos de Extração**

Após os experimentos, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia, seguido de deslocamento cervical e extraídas amostras do hipotálamo dos animais, em seguida homogeneizadas 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). O homogenato foi centrifugado a 12.000 RPM por 20 minutos. Realizou-se o método de Bradford para determinar a concentração de proteína na porção sobrenadante da amostra. Posteriormente, foi acrescido o tampão de Laemmli a cada uma das amostras, que foram 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<sup>12</sup> contendo DTT 100 mM (Sigma-Aldrich) e aquecidas por 5 minutos. Em seguida, foi realizado o preparo do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 6%) no aparelho para minigel (Mini-Protean®). Foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em

miosina (205-195 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se cubas de eletroforese da empresa Bio-Rad por aproximadamente 2 horas, a 120 volts, como previamente descrito por Towbin et al 1979<sup>13</sup>. No tampão, foi acrescido 0,1% de SDS para melhorar a eluição das proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris 10mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%, reagentes da marca Sigma Aldrich) por 2h. As membranas foram posteriormente incubadas com 2  $\mu$ L de anticorpo secundário e, posteriormente incubadas com 2 mL de solução de quimioluminescência (Pierce, CA). A reação do anticorpo secundário com a solução quimioluminescente foi detectada e visualizada com o uso de fotodocumentador. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através do programa Imagej.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados através análise de variância (ANOVA), seguida por análise de significância (Bonferroni), quando apropriado, para comparação dos grupos experimentais. A significância estatística adotada é de  $p < 0,05$ . O processamento e análise dos dados foi feita com o auxílio do software computacional GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

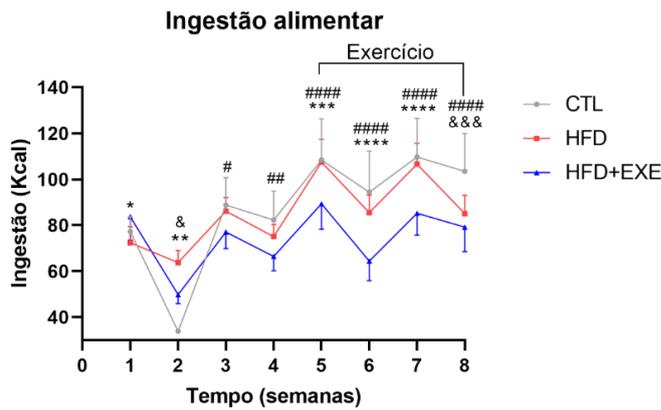
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Resultados Fisiológicos**

Foi realizada separação dos camundongos em três grupos aleatoriamente, sendo controle (CTL), high fat diet (HFD), high fat diet exercitado (HFD+EXE). O grupo HFD+EXE foi submetido a 4 semanas de esteira ergométrica em intensidade correspondente à máxima fase estável do lactato. Esses animais foram adaptados previamente ao ergômetro para minimizar possíveis estresses induzidos pelo equipamento. Ademais, foi avaliado semanalmente a ingestão alimentar e o peso corporal dos animais de cada grupo, durante 8 semanas. Em vista disso, na Figura 1A é possível observar que nas primeiras semanas os grupos tiveram oscilação na ingestão alimentar, entretanto, a partir do início do protocolo de exercício físico aeróbio, os animais HFD+EXE tiveram menor ingestão alimentar em comparação com os animais CTL e HFD.

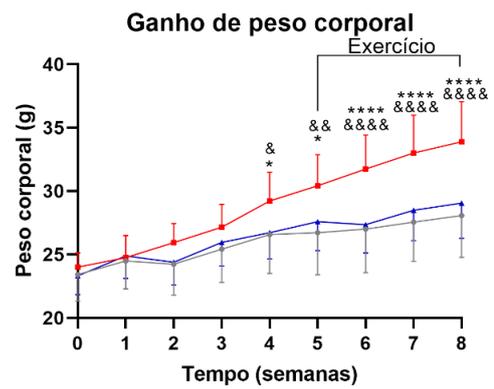
Já na Figura 1B, é possível notar o aumento do peso corporal ao longo das semanas. Nas três primeiras semanas que antecedem o exercício físico, não houve diferença estatística entre os grupos. Todavia, a partir do protocolo de exercício físico aeróbio, observa-se que o aumento de peso corporal do grupo HFD+EXE foi semelhante ao grupo CTL, atenuando o ganho de peso quando comparado ao grupo HFD., indicando que o exercício físico atuou como protetor dos efeitos causados pela dieta hiperlipídica.

**Figura 1A.**



**Figura 1A.** Ingestão alimentar (em calorias) no período de 8 semanas. Os símbolos estatísticos representam diferença estatística entre: “&”: CTL vs HFD; “#”: CTL vs HFD+EXE; “\*”: HFD vs HFD+EXE. Os símbolos representam estatísticas significativas quando: “\*”  $p < 0,05$ , “\*\*”  $p < 0,01$ , “\*\*\*”  $p < 0,001$ , “\*\*\*\*”  $p < 0,0001$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=11).

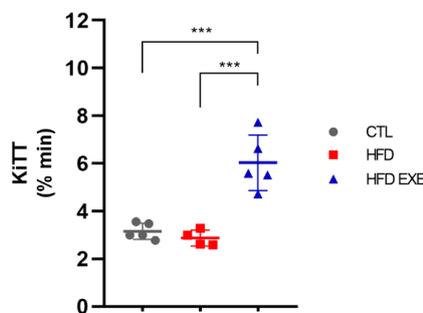
**Figura 1B.**



**Figura 1B.** Peso corporal (gramas) no período de 8 semanas. Os símbolos estatísticos representam diferença estatística entre: “&”: CTL vs HFD; “#”: CTL vs HFD+EXE; “\*”: HFD vs HFD+EXE. Os símbolos representam estatísticas significativas quando: “\*”  $p < 0,05$ , “\*\*”  $p < 0,01$ , “\*\*\*”  $p < 0,001$ , “\*\*\*\*”  $p < 0,0001$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=11).

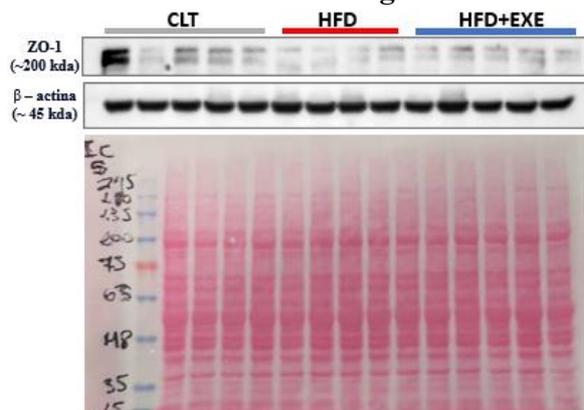
Os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (ITT) 24 horas após o protocolo de exercício físico. Com os resultados obtidos do teste foi possível realizar o cálculo da área sob a curva e determinar a Taxa de Decaimento da Glicose (KiTT), representada na Figura 2. O grupo HFD+EXE obteve a maior taxa de redução da glicemia, em comparação com os grupos CTL e HFD. Isso indica que o exercício físico promoveu maior sensibilidade à insulina.

**Figura 2.**

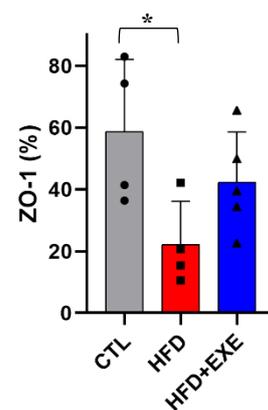


**Figura 2.** A Taxa de Decaimento da Glicose (KiTT). Teste Anova One-Way. Os símbolos representam estatísticas significativas quando: “\*”  $p < 0,05$ , “\*\*”  $p < 0,01$ , “\*\*\*”  $p < 0,001$ , “\*\*\*\*”  $p < 0,0001$ . As linhas “—” direcionam a diferença estatística entre os grupos. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).

**Resultados Western blotting**



**Figura 3A**



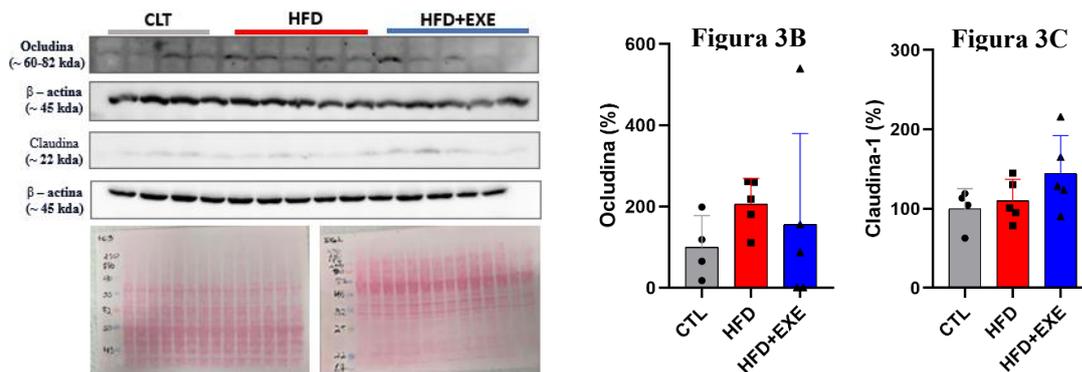


Figura 3. Expressão das proteínas de junções estreitas (em %). ZO-1 (fig.3A), Occludina (fig.3B) e Claudina-1 (fig.3C). Teste Anova One-Way. Os símbolos representam estatísticas significativas quando: “\*”  $p < 0,05$ , “\*\*”  $p < 0,01$ , “\*\*\*”  $p < 0,001$ , “\*\*\*\*”  $p < 0,0001$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ).

Na figura (3A-C), é apresentada a expressão das proteínas de junções estreitas no hipotálamo dos animais CTL, HFD e HFD+EXE. Foram comparadas as expressões das proteínas, sendo ZO-1, Occludina e Claudina-1, entre os grupos. Os resultados obtidos mostram que a expressão ZO-1 (fig.3A) foi estatisticamente menor no grupo HFD em comparação com o grupo CTL. Além disso, o exercício aeróbio recuperou cerca de 20% do conteúdo proteico de ZO-1 no hipotálamo do grupo HFD+EXE, contudo a diferença estatística não foi observada. Em contrapartida, a expressão da Occludina (fig.3B) foi menor nos grupos CTL e HFD+EXE em comparação com animais HFD, sem diferença estatística. A expressão total da Claudina-1 (fig.3C) foi praticamente igual entre os grupos

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, é possível concluir que dieta hiperlipídica afeta negativamente a expressão de parte das proteínas de junções estreitas a ZO-1, e o exercício aeróbio mesmo não obtendo diferença estatística, é um potencial meio para reduzir os efeitos causados pela dieta hiperlipídica. Além disso, foi eficaz em proteger e melhorar fisiologicamente. Melhorando a sensibilidade a insulina, redução do peso corporal e a ingestão alimentar, sendo preventivo a obesidade e doenças metabólicas associadas.

## Referências Bibliográficas

1. Timper, K. & Brüning, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis Model Mech* 10, 679–689 (2017).
2. Ropelle, E. R. et al. Physical Exercise: A Versatile Anti-Inflammatory Tool Involved in the Control of Hypothalamic Satiety Signaling. (2021).
3. Tan, B. L. & Norhaizan, M. E. Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. *Nutrients* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nu11112579> (2019).
4. Jais, A. et al. PNOARC Neurons Promote Hyperphagia and Obesity upon High-Fat-Diet Feeding. *Neuron* 106, 1009-1025.e10 (2020).
5. Elizondo-Vega, R. J., Recabal, A. & Oyarce, K. Nutrient sensing by hypothalamic tanycytes. *Frontiers in Endocrinology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00244> (2019).
6. Goodman, T. & Hajihosseini, M. K. Hypothalamic tanycytes-masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Frontiers in Neuroscience* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00387> (2015).
7. García-Cáceres, C. et al. Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nature Neuroscience* vol. 22 7–14 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0286-y> (2019).
8. Rijnsburger, M., Unmehopa, U. A., Eggels, L., Serlic, M. J. & la Fleur, S. E. One-week exposure to a free-choice high-fat high-sugar diet does not disrupt blood-brain barrier permeability in fed or overnight fasted rats. *Nutr Neurosci* 22, 541–550 (2019).
9. Yoo, S. et al. Tanycyte ablation in the arcuate nucleus and median eminence increases obesity susceptibility by increasing body fat content in male mice HHS Public Access. *Glia* 68, 1987–2000 (2020).
10. Silva, V. R. R. et al. Chronic exercise reduces hypothalamic transforming growth factor- $\beta$ 1 in middle-aged obese mice. *Aging* 9, 1926–1940 (2017).
11. Ferreira, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 760–765 (2007).
12. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).
13. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. vol. 76 (1979).