

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A RESPOSTA INTEGRADA AO ESTRESSE (ISR) E SUA RELAÇÃO COM A UPR^{mt} NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS OBESOS

Palavras-Chave: OBESIDADE; DIETA HIPERLIPÍDICA; EXERCÍCIO FÍSICO

Autores (as):

IZABELA MONTEIRO DE ARAUJO, Faculdade de Ciências Aplicadas – UNICAMP

MATHEUS BISCARO ROCHA, Faculdade de Ciências Aplicadas – UNICAMP

Prof. Dr. EDUARDO ROCHETE ROPELLE (orientador), Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Alterações na homeostase de um organismo podem causar a ativação de diversos mecanismos de reparo para evitar a morte celular, tal qual a Resposta Integrada ao Estresse (ISR) e a Resposta Mitocondrial à Proteínas Malformadas (UPR^{mt}). A ativação desses sistemas pode estar relacionada a diversos estímulos estressores, dentre eles o acúmulo de gordura no tecido hepático, característico da esteato hepatite não alcoólica. Isso se dá por uma estreita relação entre as atividades do fígado e as mitocondriais, principalmente pela abundância dessa organela nesse tecido e sua íntima relação com o metabolismo energético. Assim, este estudo tem como objetivo investigar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico aeróbio sobre a UPR^{mt} e, conseqüentemente, sobre a ISR a partir do tecido hepático de camundongos obesos.

METODOLOGIA:

Objetivos

- Avaliar as alterações de peso corporal e ingestão alimentar em decorrência da dieta hiperlipídica e ao exercício físico.
- Avaliar o conteúdo das proteínas Lonp1 e HSP60, conhecidas como marcadores de UPR^t, além de pelf2 α , marcador de ISR, no fígado de camundongos obesos com esteato hepatite não alcoólica em resposta ao exercício físico aeróbio.

Materiais e métodos

Foram utilizados camundongos machos Swiss advindos do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), os quais foram pré-pesados e alocados em gaiolas de cinco animais cada e submetidos a exposição de ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro a uma climatização com temperaturas entre 20°C e 22°C. O tratamento foi feito com água e ração padrão para roedores (da Nuvilab) ou ingestão de dieta rica em gordura saturada (HFD) ad libitum por 8 semanas. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UNICAMP, registrado pelo nº 5694-1/2021.

Os animais foram divididos em três grupos: Controle (CTL), High Fat (HFD) e High Fat Treinados (HFD + TR). Após 8 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, o terceiro grupo foi submetido ao treinamento aeróbio em esteira ergométrica, com intensidade correspondente a máxima fase estável do lactato (FERREIRA, J. C. B. et al., 2007), durante 4 semanas. Antes disso os animais foram adaptados ao ergômetro para minimizar possíveis estresses causados pelo uso do equipamento.

Posterior ao protocolo completo de dieta e exercício, todos os animais foram eutanasiados por meio de aprofundamento de anestesia e deslocamento cervical, seguido da extração do tecido hepático. Assim, as amostras foram preparadas para a utilização na técnica de Western Blotting, a partir do uso de 0,05g de fígado para 1000 µL de 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, submetidos a temperatura de 4 °C, utilizando reagentes da marca Sigma-Aldrich), que posteriormente foram homogeneizados na máquina Tissuelyser e centrifugados a 11.000 RPM por 30 minutos, para que assim fosse possível a separação do sobrenadante.

Após, foi realizada a padronização do conteúdo proteico por meio do método de Bradford, sendo acrescido a cada uma das amostras quantidades correspondentes de tampão de Laemmli contendo DTT 100 mM (Sigma-Aldrich). As amostras foram fervidas por 5 minutos e armazenadas no freezer à temperatura de -80°C, e posteriormente aplicadas em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE a 6%) no aparelho para mini gel (Mini-Protean® - BioRad). Foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em miosina (205-195 kDa), β-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, por meio de cubas de eletroforese da empresa Bio-Rad por aproximadamente 2 horas, a 120 volts. Assim, foi utilizada solução de Ponceau para avaliar a carga proteica transferida para a membrana. Após, foi realizada a incubação da membrana em uma solução bloqueadora (leite desnatado 5%; Tris 10mM; NaCl 150 mM e Tween 20 0,02% - todos reagentes da marca Sigma Aldrich) por 2 horas, para diminuir possíveis aparecimentos de ligações inespecíficas do anticorpo.

Após, as membranas foram incubadas overnight a 4°C com anticorpo primário, de acordo as recomendações de diluição do fornecedor. Em seguida foram realizadas lavagens com solução TBST para só então a realização da incubação do anticorpo secundário, por aproximadamente 2 horas a 4°C. Essa etapa foi sucedida pela adição de 2 mL de solução de quimiluminescência (Pierce, CA), o que causa uma reação com o anticorpo secundário e permite a detecção da carga proteica por meio do uso de foto documentador. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através do programa Uniscan®.

Os reagentes e instrumentação para géis de dodecil sulfato de sódio (SDSPAGE) utilizados são da Bio-Rad (Richmond, CA), assim como a membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2 mm). Os compostos Tris Hidroximetil Aminometano (TRIS), Fenilmetil Sulfonil Fluorido (PMSF), Aprotinina e Ditioneitol (DTT) foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Os anti-corpos foram provenientes das seguintes empresas: anti-Lonp1 - BIOSS; Anti-HSP60 e anti-peif2a – Cell; OXPHOS – ABCAM.

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

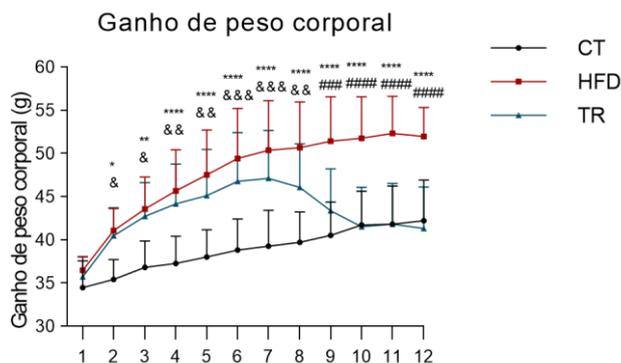
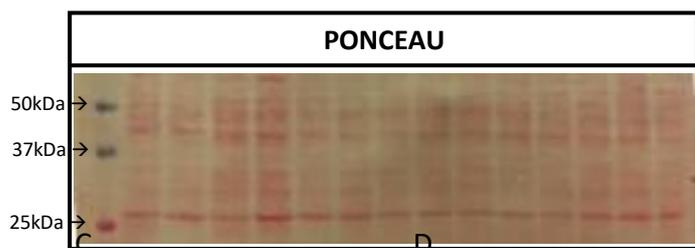


Figura 1. Ganho de peso Corporal (em gramas) e tempo em semanas. Os símbolos representam diferença estatística entre: “*”: CTL vs HFD; “&”: CTL vs TR; “#”: HFD vs TR. “*” = valor p de 0.01 até 0.05, “**” = valor p de 0.001 até 0.01, “***” = valor p de 0.0001 até 0.001 e “****” = valor p < 0,0001. CT: n=10; HFD: n=9; e TR: n=8.

Na **Figura 1** observamos que os grupos iniciaram o protocolo com valores de peso corporal bem próximos, e apenas no decorrer das semanas houve um aumento considerável deste nos grupos de camundongos tratados com dieta hiperlipídica, em comparação com o grupo controle. Apesar disso, o grupo High Fat Treinado apresentou um declínio no ganho de massa a partir do início do protocolo de treinamento aeróbico, caracterizando o caráter preventivo que a prática de exercícios físicos demonstra contra a obesidade.

Fig. 2 A.



B.

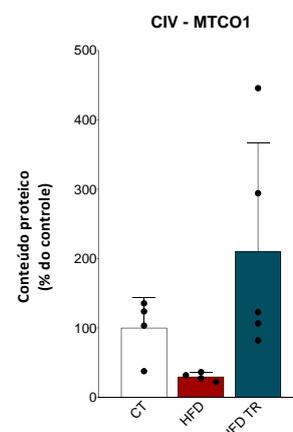
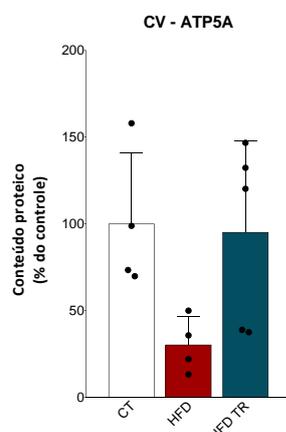
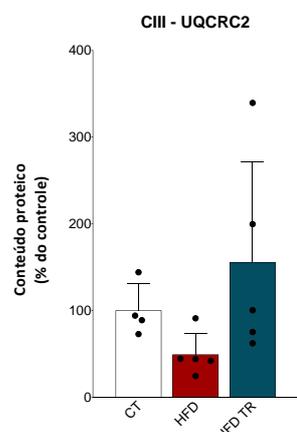
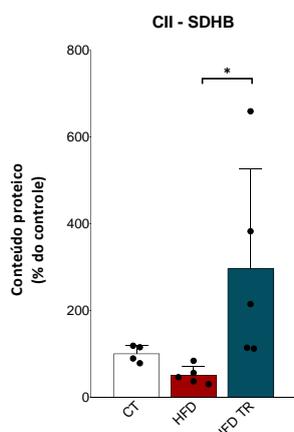
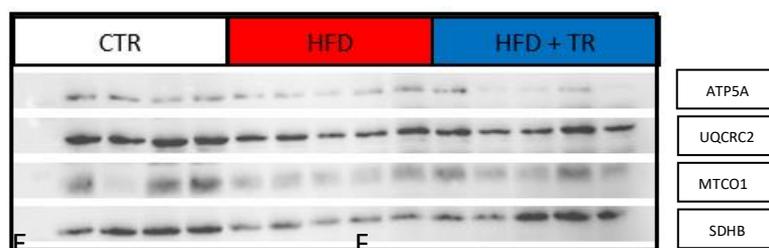


Figura 2 Efeito do exercício físico sobre marcadores de atividade mitocondrial no tecido hepático de camundongos obesos. (A-B-C-D-E-F). (C- D- E- F) Conteúdo proteico dos complexos da cadeia de fosforilação oxidativa. (n=4-5) * = $p < 0,05$.

Analisando valores de conteúdo proteico obtidos a partir da técnica de Western Blotting para marcadores de atividade mitocondrial do complexo de fosforilação oxidativa descritos na **figura 2**, foi observada mudança significativa apenas no Complexo II, quando comparamos os grupos HFD e HFD + TR. Apesar disso, houve uma tendência de diminuição de conteúdo proteico dos demais complexos no grupo tratado com dieta hiperlipídica (HFD), e notável recuperação e até superação deste no grupo submetido ao treinamento aeróbio (HFD + TR).

Fig. 3 A.

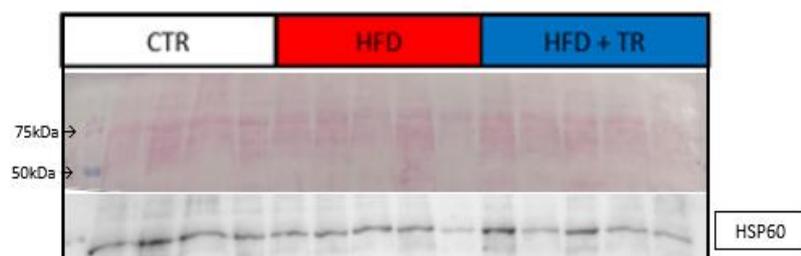
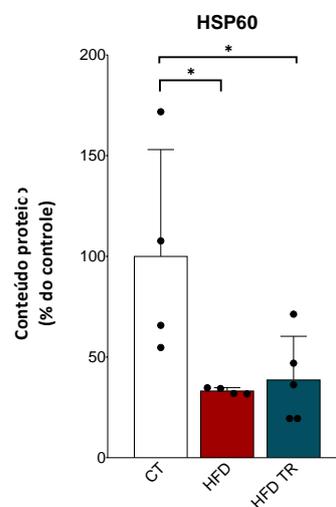


Figura 3 Efeito do exercício físico sobre marcadores de UPR^{mt} no tecido hepático de camundongos obesos. (A-B). Conteúdo proteico de HSP60 (n=4-5) * = p < 0,05

B.



O gráfico presente na **figura 3B** mostra que também houve diferença estatística no conteúdo proteico de HSP60, um marcador UPR^{mt}, no fígado de camundongos obesos, na comparação entre o grupo controle e os dois grupos tratados com dieta hiperlipídica. Assim, os dados indicam que esse tipo de dieta pode suprimir o mecanismo de reparação mitocondrial.

Fig. 4 A.

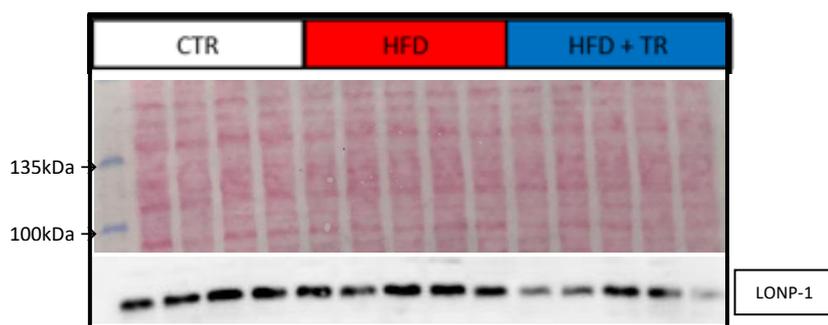
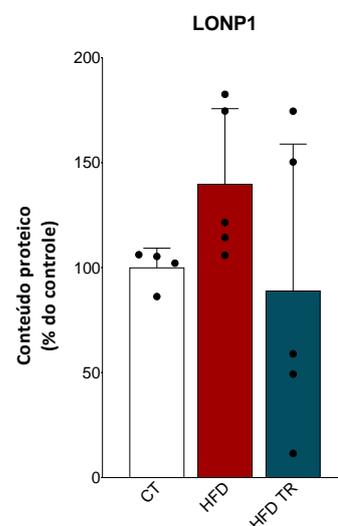


Figura 4 Efeito do exercício físico sobre marcadores de UPR^{mt} no tecido hepático de camundongos obesos. (A-B). Conteúdo proteico de LONP-1 (n=4-5) * = p < 0,05

B.



Apesar disso, não houve diferença significativa em nenhum dos dois marcadores de UPR^{mt} (HSP60 e LONP-1) entre os grupos tratados com High Fat e aqueles que associaram a dieta hiperlipídica ao treinamento.

Fig. 5 A.

B.

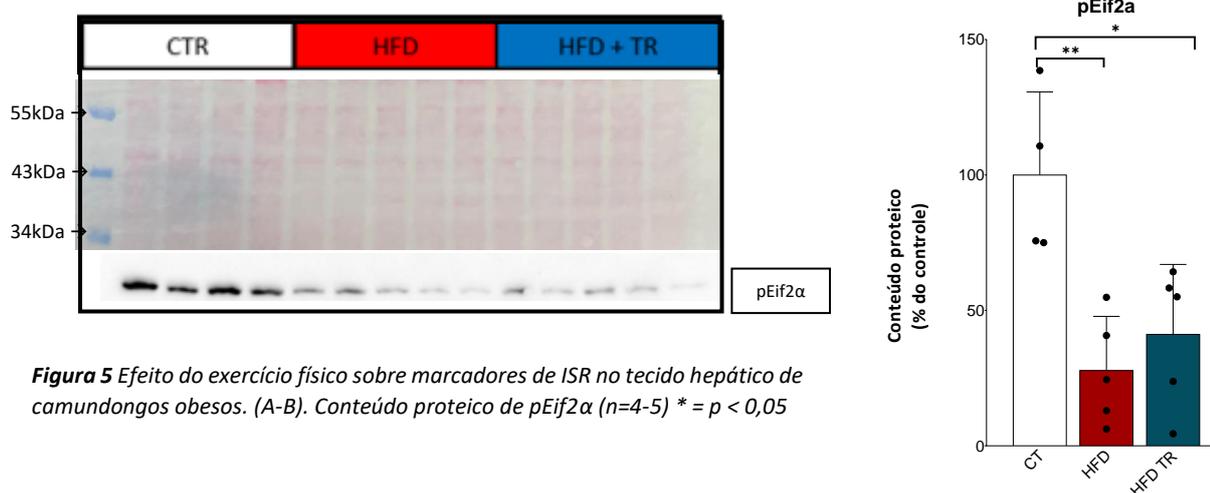


Figura 5 Efeito do exercício físico sobre marcadores de ISR no tecido hepático de camundongos obesos. (A-B). Conteúdo proteico de pEif2α (n=4-5) * = p < 0,05

A mesma tendência mostrada para HSP60 aparece no gráfico da **figura 5B**, o qual descreve o conteúdo proteico de pEif2a no fígado dos camundongos. Esse marcador é característico da Resposta Integrada ao Estresse, e, portanto, demonstra que esse mecanismo também deve ter sua atividade diminuída atrelada ao consumo excessivo de gorduras, mas não houve diferença em relação ao grupo treinado.

CONCLUSÕES:

A partir dos expostos acima, podemos concluir que o treinamento físico aeróbico contribuiu para a prevenção da obesidade, mas não foi capaz de reverter significativamente a deleção de mecanismos de recuperação celular e mitocondrial, ISR e UPR^{mt} respectivamente, promovida pelo acúmulo de gordura no tecido hepático. Apesar disso, há uma tendência notável de diminuição desses efeitos após as 4 semanas de treinamento, principalmente da recuperação das proteínas relacionadas ao sistema de fosforilação oxidativa. Além disso, pode-se dizer que os dois mecanismos de reparo demonstraram comportamentos parecidos, o que caracteriza a proximidade entre os dois.

BIBLIOGRAFIA

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, 2007.

TOWBIN, H., STAHELIN, 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).

LU, H. et al. Mitochondrial Unfolded Protein Response and Integrated Stress Response as Promising Therapeutic Targets for Mitochondrial Diseases. **Cells**, v. 12, n. 1, 2023.

LIU, Y. et al. Effects of aerobic exercise on metabolic indicators and physical performance in adult NAFLD patients: A systematic review and network meta-analysis. **Medicine**, v. 102, n. 14, p. e33147, 2023.