"Estrógeno modula ligeiramente a expressão de fibronectina na matriz extracelular hipotalâmica de camundongos fêmeas submetidos à dieta hiperlipídica"

Palavras-Chave: FIBRONECTINA, ESTRÓGENO, HIPOTÁLAMO, INFLAMAÇÃO

Autores:

GIOVANNA ARIOZI DOS SANTOS, FCM – UNICAMP

LARISSA DA SILVA BERGANTINI, FCM – UNICAMP

IGOR VINÍCIUS SOUSA CAVALHEIRO, FCM - UNICAMP

VINÍCIUS STEFANINI MANTOVAN, USF – UNIVERDADE SÃO FRANCISO

Prof. Dr. LICIO AUGUSTO VELLOSO, FCM - UNICAMP

Profª. Drª. NATÁLIA FERREIRA MENDES (orientadora), FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O hipotálamo é um órgão fundamental na manutenção da homeostase energética. Ele recebe sinais metabólicos e hormonais que refletem o estado nutricional do organismo e coordena respostas neuroendócrinas e comportamentais para manter o equilíbrio do peso corporal. A regulação do balanço energético depende da interação entre neurônios orexígenos (como AgRP e NPY) e anorexígenos (como POMC e CART), localizados no núcleo arqueado do hipotálamo, garantindo a estabilidade da massa corporal.

Alterações funcionais e estruturais, resultantes de um processo inflamatório, ocorrem no hipotálamo após o consumo excessivo de dieta rica em gordura (HFD). A inflamação hipotalâmica é mediada por células residentes do tecido neural, como neurônios e células da glia, mas também por macrófagos perivasculares e células imunes periféricas que infiltram o hipotálamo na fase crônica da inflamação. O ambiente pró-inflamatório compromete a barreira hematoencefálica (BHE), gera resistência hormonal (como à leptina), prejudica a função das células do tecido e reduz a capacidade neurogênica do hipotálamo. Em conjunto, essas adaptações podem resultar em disfunção hipotalâmica, contribuindo com o desenvolvimento de obesidade.

A obesidade é caracterizada por acúmulo excessivo de gordura corporal e está associada a comorbidades, como doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2. Esse distúrbio metabólico resulta do desequilíbrio energético, ou seja, quando a ingestão de energia supera o gasto. Em condições normais, o aumento na gordura corporal eleva os níveis de leptina circulante, sinalizando ao cérebro para reduzir a ingestão. Paralelamente, após uma refeição, o trato gastrointestinal envia ao hipotálamo sinais de saciedade, como incretinas, bem como sinaliza via nervo vago. Dessa forma, o hipotálamo integra esses sinais homeostáticos sinais hedônicos, regulando a ingestão alimentar e o gasto

energético. Na obesidade, devido à inflamação hipotalâmica já instalada, esse mecanismo de feedback pode estar comprometido, contribuindo para a hiperfagia.

Apesar dos avanços quanto ao papel de diferentes tipos celulares na inflamação hipotalâmica induzida por HFD, a função da matriz extracelular (MEC) nesse contexto e sua interação com células do tecido neural ainda são pouco conhecidas. A MEC é uma rede tridimensional formada por macromoléculas como colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, dentre outras glicoproteínas. Possui um papel na manutenção da homeostase, oferecendo suporte físico e proteção mecânica aos tecidos. Além disso, regula interações entre células do parênquima e células imunes que são atraídas para locais inflamados, podendo mediar a sinalização celular e modular a inflamação.

Metaloproteinases da matriz (MMPs) promovem o remodelamento da MEC de forma dinâmica, o que pode ser prejudicado em quadros inflamatórios. Na obesidade, por exemplo, mediadores inflamatórios favorecem a infiltração de monócitos e a diferenciação em macrófagos no tecido adiposo branco; estes passam a secretar citocinas pró-inflamatórias alterando a MEC. No hipotálamo também se observa infiltração de células imunes medidas pela inflamação induzida por HFD, contudo, ainda não se sabe se essas células contribuem com o remodelamento da MEC no parênquima hipotalâmico.

Vários estudos já demonstraram a existência de um dimorfismo sexual importante no metabolismo. O sexo biológico influencia significativamente não apenas os desfechos metabólicos, mas também padrões de alimentação: machos são mais propensos à disfunções metabólicas, como intolerância à glicose e resistência à insulina, enquanto fêmeas apresentam perfis mais protetores, como maiores níveis de leptina e uma maior resistência à obesidade induzida por dieta. Células da glia no hipotálamo também respondem de forma diferente à HFD: machos são mais vulneráveis à inflamação, enquanto as fêmeas mostram maior resiliência, em parte devido a diferenças no comportamento das células gliais e na neurogênese.

Recentemente demonstrou-se um dimorfismo sexual significativo no transcriptoma de células que infiltram o hipotálamo no contexto da inflamação induzida por HFD, o que pode afetar os mecanismos quimiotáticos que orientam essas células ao parênquima, processo que depende da interação de seus receptores com componentes da ECM. As fêmeas apresentam ativação precoce da sinalização de quimiocinas, portanto presume-se que diferenças em doenças metabólicas são influenciadas principalmente por hormônios esteroides sexuais, como o estrogênio.

Diante disso, o objetivo desse estudo é investigar como variações nos níveis de estrógeno, após procedimento de ovariectomia bilateral, com e sem reposição hormonal, afetam a expressão gênica de componentes da MEC no hipotálamo diante de um cenário de inflamação hipotalâmica.

METODOLOGIA:

Doze fêmeas foram submetidas ao procedimento de ovariectomia bilateral, metade das fêmeas ovariectomizadas (N=6) receberam terapia de reposição de estradiol (grupo OVX+Estrógeno), enquanto a outra metade não (grupo OVX). Outras seis formarão o grupo SHAM, que serve como controle para assegurar que quaisquer alterações observadas não sejam atribuíveis a fatores não específicos

relacionados ao procedimento cirúrgico. O delineamento experimental com a distribuição dos animais nos grupos experimentais está apresentado na Figura 1.

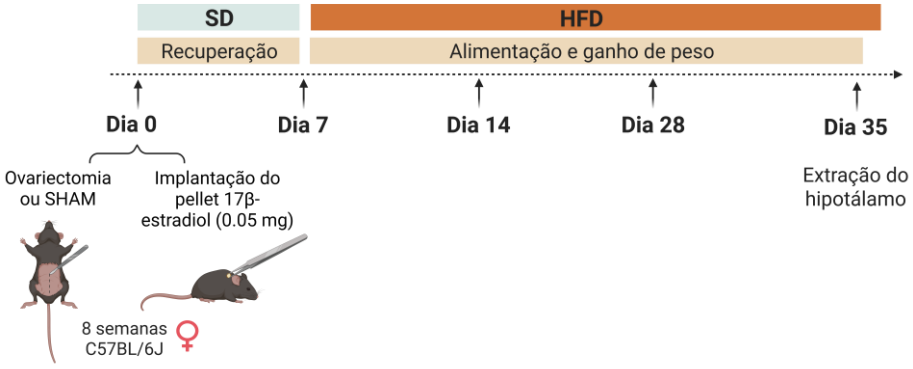


Figura 1 – Delineamento experimental.

Para a coleta dos tecidos, ao final de cada delineamento experimental, os camundongos serão colocados em jejum por 6 horas e, em seguida, anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Após perderem todos os reflexos, serão decapitados.

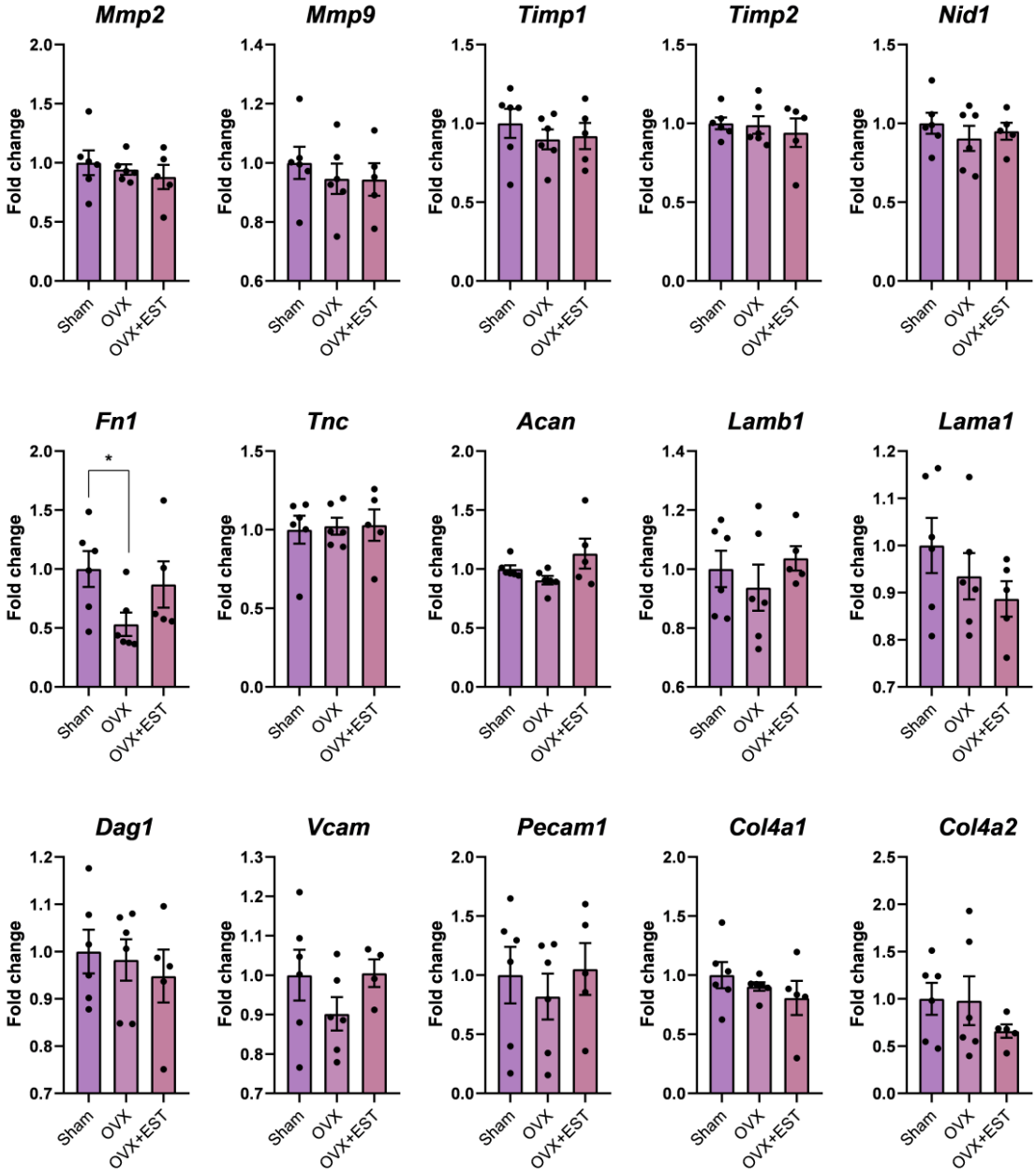
O conteúdo de RNA total será extraído dos tecidos utilizando-se protocolo com reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Dois µg de RNA total serão transcritos de forma reversa para cDNA de acordo com as instruções do fabricante do kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies). A expressão de genes através de RT-qPCR será feita com TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies). A análise da expressão gênica será realizada por um sistema de detecção ABI Prism 7500 sequence (Applied Biosystems).

Os primers serão adquiridos da Applied Biosystems e da Integrated DNA Technologies (IDT). A expressão de GAPDH será utilizada como controle endógeno em todas as amostras. Os genes analisados serão: MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, VCAN; ACAN; TNC; FN1; COL4A1, COL4A2; LAMA1; LAMB1; NID1, DAG1, PECAM1. Os dados obtidos no RT-qPCR serão analisados usando o Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

Os dados estão apresentados como média ± EP, com o número de experimentos por grupo nas legendas. Foi utilizada ANOVA de uma via Mann-Whitney. A normalidade dos dados foi verificada e o nível de significância será de 5%. Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prism 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Nenhuma diferença significativa na expressão gênica hipotalâmica foi observada entre os grupos OVX+EST e OVX em fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica (HFD), embora a maioria dos genes analisados apresentaram leve *downregulation* entre esses grupos, havendo uma recuperação dos níveis basais após terapia hormonal com estrógeno. No entanto, Fn1, gene que codifica a fibronectina, uma proteína chave envolvida na adesão e migração celular apresentou redução significativa no grupo OVX em comparação ao grupo SHAM (P = 0,0491).



CONCLUSÕES:

Embora não tenham alcançado significância estatística, a maioria dos genes analisados mostrou alterações leves na expressão no grupo OVX em relação ao SHAM, as quais pareceram ser revertidas pela reposição de estrogênio. A redução da expressão de Fn1 no hipotálamo de camundongos fêmeas ovariectomizadas sugere um possível papel do estrogênio na regulação de vias mediadas por fibronectina, envolvidas na inflamação hipotalâmica. Estudos em andamento estão investigando o remodelamento da MEC em condições não inflamatórias, em fêmeas mantidas com dieta padrão.

BIBLIOGRAFIA

TRAN, L. T. et al. **Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis**. Experimental & Molecular Medicine, v. 54, p. 358–369, 2022.
ENGEL, D. F.; VELLOSO, L. A. **The timeline of neuronal and glial alterations in experimental obesity**. Neuropharmacology, v. 208, p. 108983, 2022.
CAZETTES, F. et al. **Obesity-mediated inflammation may damage the brain circuit that regulates food intake**. Brain Research, v. 1373, p. 101–109, 2011.
DOYLE, A. D.; NAZARI, S. S.; YAMADA, K. M. **Cell-extracellular matrix dynamics**. Physical Biology, v. 19, n. 2, 2022.
MUSALE, V.; WASSERMAN, D. H.; KANG, L. **Extracellular matrix remodelling in obesity and metabolic disorders**. Life Metabolism, v. 2, n. 4, p. load021, 2023.
SOROKIN, L. **The impact of the extracellular matrix on inflammation**. Nature Reviews Immunology, v. 10, n. 10, p. 712-723, 2010.
CATALÁN, V. et al. **Role of extracellular matrix remodelling in adipose tissue pathophysiology: relevance in the development of obesity**. Histology and Histopathology, v. 27, n. 12, p. 1515-1528, 2012.
KOCEVA, A. et al. **Sex- and gender-related differences in obesity: from pathophysiological mechanisms to clinical implications**. International Journal of Molecular Sciences, v. 25, n. 13, p. 7342, 2024.
PALMER, B. F.; CLEGG, D. J. **The sexual dimorphism of obesity**. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 402, p. 113-119, 2015.
CHOWEN, J. A.; FREIRE-REGATILLO, A.; ARGENTE, J. **Neurobiological characteristics underlying metabolic differences between males and females**. Progress in Neurobiology, v. 176, p. 18–32, 2019.