

Deleção seletiva de HIF1-alfa no endotélio modula o balanço energético de forma sexo-dependente

Palavras-Chave: DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, HIPOTÁLAMO, HIPÓXIA, METABOLISMO

Autores:

VINÍCIUS STEFANINI MANTOVAN, USF – UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

IGOR VINÍCIUS SOUSA CAVALHEIRO, FCM - UNICAMP

NICOLLY PORTO MARIN, FCM - UNICAMP

LARISSA DA SILVA BERGANTINI, FCM - UNICAMP

Prof. Dr. LICIO AUGUSTO VELLOSO, FCM - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. NATÁLIA FERREIRA MENDES (orientadora), FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O hipotálamo é uma área cerebral responsável pela regulação do balanço energético e de outras funções homeostáticas do organismo. O consumo de uma dieta rica em gordura resulta em inflamação hipotalâmica, com prejuízos na regulação do metabolismo, contribuindo, assim, com o desenvolvimento de obesidade. Essa resposta inflamatória é caracterizada por alterações funcionais e morfológicas nas células do tecido neural, mas também por alterações na rede vascular hipotalâmica, tais como maior fragilidade da barreira hematoencefálica, disfunção endotelial, aumento de angiogênese e dos níveis do fator indutor de hipóxia HIF1-alfa.

Essas alterações, somadas à presença de capilares fenestrados na eminência mediana - órgão circumventricular adjacente ao hipotálamo - favorecem o influxo de ácidos graxos livres para o parênquima hipotalâmico no contexto de uma dieta rica em gordura, contribuindo com o desenvolvimento de disfunção neuronal das redes neurais responsáveis pela regulação do balanço energético. Além disso, essas mudanças na rede vascular hipotalâmica podem contribuir com o influxo de células mielóides para essa região.

Através de análise bioinformática de dados de *single-cell* RNA sequencing (scRNA-seq) da região do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) e da eminência mediana, identificamos que as células endoteliais dos vasos sanguíneos que irrigam o parênquima hipotalâmico expressam a quimiocina CXCL12. Em diferentes tecidos já foi demonstrado que a CXCL12 é modulada pelo HIF1-alfa; em condições de hipóxia HIF-1 α ativa CXCL12 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Enquanto o VEGF promove angiogênese, CXCL12 recruta células imunes por quimiotaxia para o tecido. Contudo, ainda não se sabe como essas moléculas participam das alterações vasculares e da

quimiotaxia de células imunes durante a inflamação hipotalâmica, e/ou se a expressão de HIF1-alfa endotelial influencia o balanço energético através da modulação desses processos mediados por CXCL12 e VEGF.

Para melhor compreender esses mecanismos, este estudo tem como objetivo avaliar o impacto metabólico da deleção seletiva de HIF1-alfa no endotélio através de camundongos transgênicos machos e fêmeas alimentados em dieta padrão.

METODOLOGIA:

Para deletar HIF1-alfa no endotélio cruzamos camundongos VECad^{Cre} com camundongos HIF-1 α ^{Flox} (**Figura 1**). No desmame (P21), as proles (machos e fêmeas) foram separadas por sexo e divididas em subgrupos: Cre-Lox (mutantes) e WT/Lox (controles). A mutação foi confirmada por genotipagem (**Figura 2**).

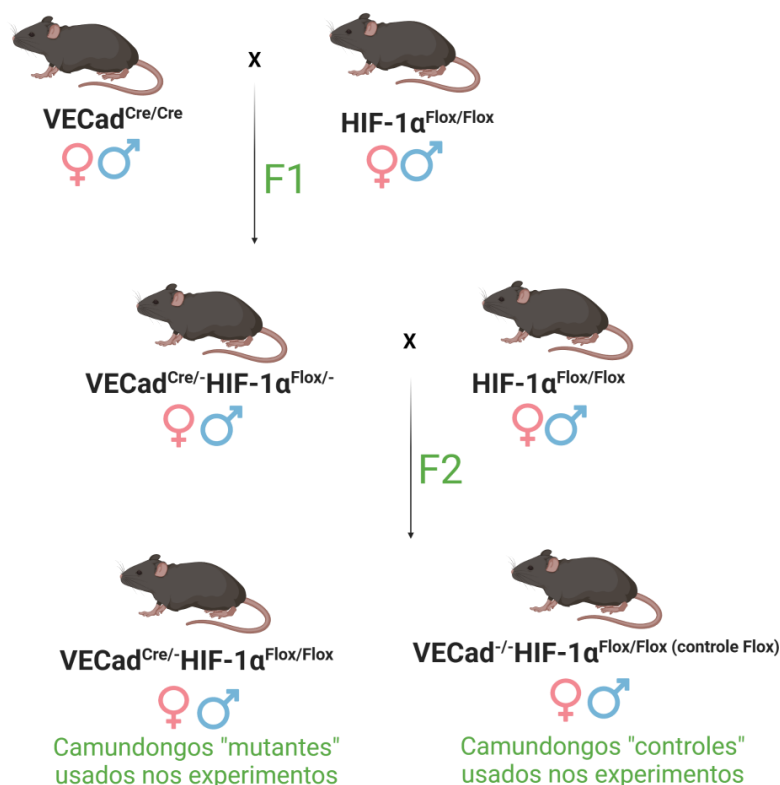


Figura 1 - Esquema de cruzamentos para obtenção das linhagens que foram usadas nos experimentos de deleção de HIF-1 α nas células endoteliais e controles.

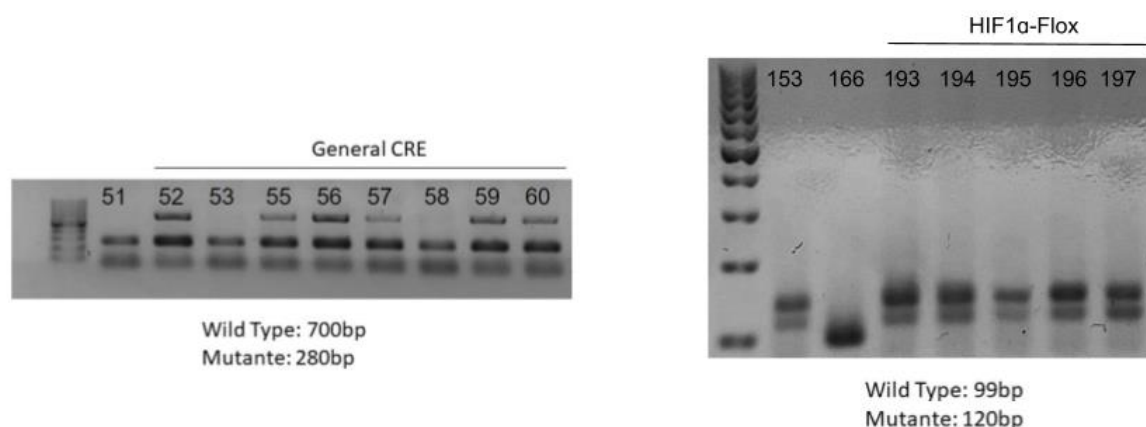


Figura 2 - Imagens representativas da genotipagem para confirmação de HIF1 α -Flox e General CRE. A amostra 153 é um controle positivo (HIF1 α -Flox homozigoto), e a amostra 166 é um controle negativo (VECad-CRE), e as outras amostras são proles desse cruzamento.

Durante todo o experimento, os animais permaneceram em dieta padrão. Do dia do desmame (P21) à 10^a semana de vida, aferimos semanalmente a massa corporal. Ao final do protocolo, após jejum de 6h, medimos a glicemia de jejum, a massa corporal e coletamos tecido adiposo branco retroperitoneal (rWAT) e fígado para análise morfológica. O hipotálamo foi dissecado para futuras análises por qPCR. O desenho experimental está apresentado na **Figura 3**.

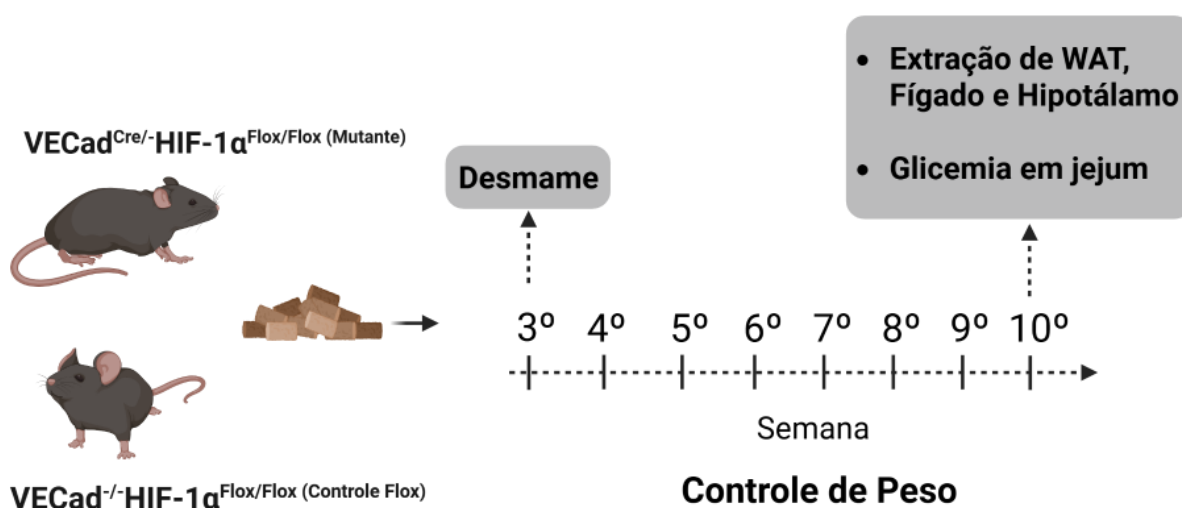


Figura 3 - Desenho experimental para controle de peso, glicemia em jejum e extração dos tecidos para realização de qPCR e análises morfológicas.

O protocolo experimental foi aprovado pelo CEUA IB/UNICAMP: 6326-1/2023 e CIBio FCM/UNICAMP: 09/23.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na análise metabólica, as fêmeas Cre-Lox apresentaram aumento do ganho de peso semanal ($p<0,0001$) e cumulativo ($p=0,0317$) em comparação com as fêmeas WT/Lox, enquanto não foram observadas diferenças no peso corporal entre os grupos de machos (**Figura 4**).

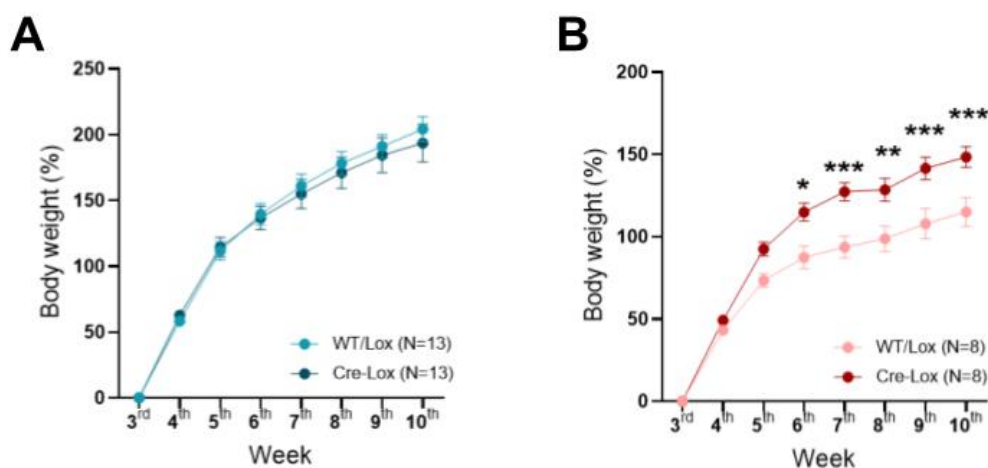


Figura 4 - Percentual de variação do peso corporal A) Percentual de machos em relação ao peso no P21 e B) Percentual de fêmeas em relação ao peso no P21.

Nas fêmeas foi encontrado diferenças nos níveis de glicose em jejum no grupo Cre-Lox em comparação às fêmeas WT-Lox, enquanto não foi observado diferenças nos machos, como também em ambos os sexos não foi observado diferenças no peso do depósito de tecido adiposo retroperitoneal.

Na análise morfológica, as fêmeas Cre-Lox apresentaram acúmulo de lipídios nos hepatócitos e aumento do tamanho dos adipócitos em comparação com as fêmeas WT-Lox — alterações morfológicas que estavam ausentes nos machos (**Figura 5**).

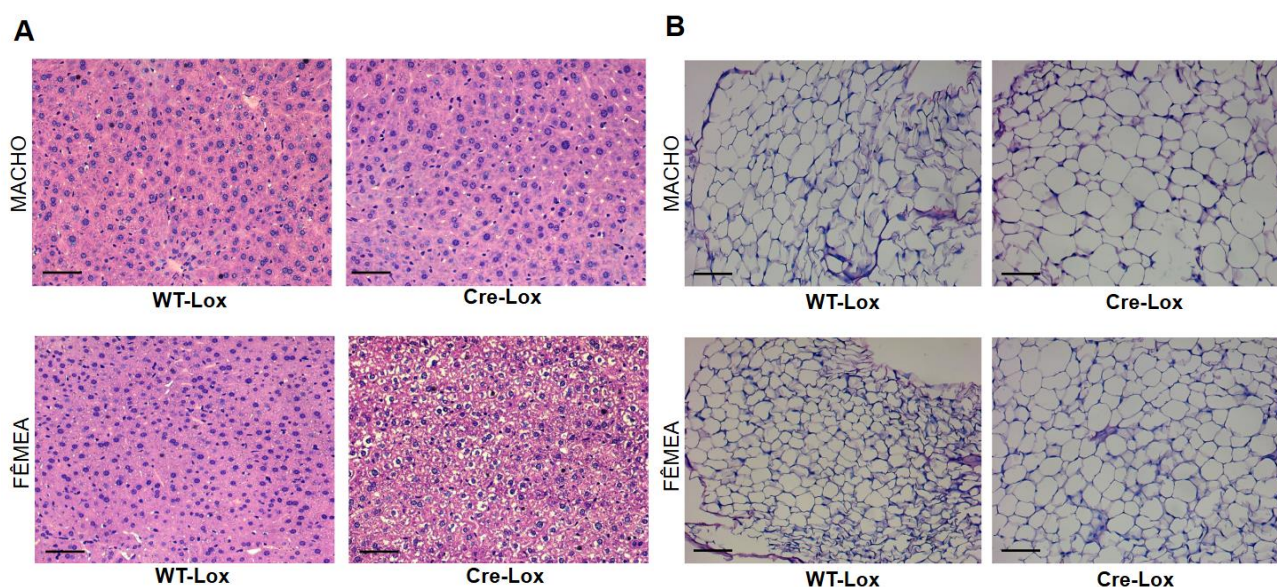


Figura 5 - Análise morfológica de fígado e tecido adiposo branco (WAT) de VECad^{Cre/-}HIF-1 α ^{Flox/Flox} (Cre-Lox) e VECad^{-/-}HIF-1 α ^{Flox/Flox} (WT-Lox) machos e fêmeas. A) Lâminas histológicas de fígado coradas com H&E e B) Lâminas histológicas de

Na análise de RT-qPCR do hipotálamo em machos, não foram encontradas diferenças significativas na expressão gênica entre os grupos. A análise do hipotálamo em fêmeas ainda está em andamento.

CONCLUSÕES:

Nossos dados sugerem que a deleção de HIF1-alfa endotelial provoca efeitos específicos de sexo, com as fêmeas apresentando maior suscetibilidade a distúrbios na homeostase energética. Para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes, realizaremos análise de RT-qPCR em amostras hipotalâmicas dos grupos de fêmeas (WT-Lox e Cre-Lox). Nas próximas etapas do estudo, também investigaremos se a deleção de HIF1-a no endotélio altera a expressão endotelial de CXCL12 e VEGF, bem como os processos de quimiotaxia e angiogênese por eles modulados, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- Bai Y & Sun Q. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obes Rev.* 2015;16(2):127-36.
- Lee BC & Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(3):446-62.
- Huber J, et al. CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(8):3215-21.
- Thaler JP, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 2012;122:153–62.
- Carraro RS, et al. Hypothalamic mitochondrial abnormalities occur downstream of inflammation in diet-induced obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2018, 460, 238–245.
- Cansell C, et al. Dietary fat exacerbates postprandial hypothalamic inflammation involving glial fibrillary acidic protein-positive cells and microglia in male mice.
- Rodríguez EM, et al. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 2010;31:757–76.
- Spiegelman BM & Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001;104:531–43.
- Gaspar JM, et al. Downregulation of HIF complex in the hypothalamus exacerbates diet-induced obesity. *Brain Behav Immun.* 2018;73:550-561.