



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



ANDRESSA REGINATO

**AVALIAÇÃO DE AUTOFAGIA HIPOTALÂMICA EM RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM ÁCIDO GRAXO SATURADO *IN VITRO* E *IN
VIVO*: RELAÇÃO COM VIAS INFLAMATÓRIAS**

NEURONAL AUTOPHAGY MODULATION IN RESPONSE TO FATTY ACIDS- *IN
VIVO* AND *IN VITRO*: RELATIONSHIP WITH INFLAMMATORY PATHWAYS

LIMEIRA
2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



ANDRESSA REGINATO

**AVALIAÇÃO DE AUTOFAGIA HIPOTALÂMICA EM RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM ÁCIDO GRAXO SATURADO *IN VITRO* E *IN
VIVO*: RELAÇÃO COM VIAS INFLAMATÓRIAS**

NEURONAL AUTOPHAGY MODULATION IN RESPONSE TO FATTY ACIDS- *IN
VIVO* AND *IN VITRO*: RELATIONSHIP WITH INFLAMMATORY PATHWAYS

*Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do
título de Doutora em Ciências da
Nutrição e do Esporte e Metabolismo na
na Área de Nutrição.*

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Marciane Milanski Ferreira.

Coorientadora: Prof(a). Dr(a). Adriana Souza Torsoni.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA ANDRESSA REGINATO E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. MARCIANE MILANSKI.

LIMEIRA
2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

R263a Reginato, Andressa, 1990-
Avaliação da autofagia hipotalâmica em resposta ao tratamento com ácido graxo in vitro e in vivo : relação com vias inflamatórias / Andressa Reginato. – Limeira, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Marciane Milanski Ferreira.
Coorientador: Adriana Souza Torsoni.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Obesidade. 2. Autofagia. 3. Hipotálamo. 4. Neurônios. 5. Ácidos graxos. I. Milanski, Marciane, 1972-. II. Torsoni, Adriana Souza, 1973-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Neuronal autophagy modulation in response to fatty acids in vitro and in vivo : relationship with inflammatory pathways

Palavras-chave em inglês:

Obesity
Autophagy
Hypothalamus
Neurons
Fatty acids

Área de concentração: Nutrição

Titulação: Doutora em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Marciane Milanski Ferreira [Orientador]
Augusto Ducati Luchesi
Fernando Moreira Simabuco
Karina Thieme
Marcia Queiroz Latorraca

Data de defesa: 14-10-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6408-7000>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0077395283553711>

FOLHA DE APROVAÇÃO:

Autora: Andressa Reginato

Orientadora: Profa. Dra. Marciane Milanski Ferreira

Título: Avaliação de autofagia hipotalâmica em resposta ao tratamento com ácido graxo saturado *in vitro* e *in vivo*: relação com vias inflamatórias

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 14/10/2019

Banca examinadora:

1. Profa. Dra. Marciane Milanski Ferreira (Presidente);
2. Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi (Avaliador);
3. Profa. Dr. Fernando Moreira Simabuco (Avaliador);
4. Profa. Dra. Karina Thieme (Avaliadora);
5. Prof. Dra. Márcia Queiroz Latorraca (Avaliadora).

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA:

"Dedico esse trabalho a todos que me acompanham e possibilitam a minha jornada acadêmica desde o início da graduação até os dias atuais. Em especial minha mãe Cidinha, meu pai Gerson e meu tio Silvio que me amam incondicionalmente e estão ao meu lado em todos os momentos da minha vida, me guiando nas dificuldades rumo as realizações!"

AGRADECIMENTOS:

Este trabalho representa a finalização de um sonho que comecei a imaginar lá atrás em 2009 quando entrei na graduação. Comecei o doutorado no ano de 2015 e esse documento oficial representa um pouco do que foi a minha jornada nesses últimos anos.

Sou extremamente agradecida a Deus por me presentear dia após dia com saúde para que eu corra atrás dos meus sonhos, objetivos bem como viver a vida como ela deve ser vivida! Momentos bons e ruins fazem parte de nosso trabalho, nossa vida pessoal.... E com a fé de que tudo acontece por um propósito temos sempre força para superar os limites de nossa capacidade e seguir em frente!

À minha orientadora Marciane Milanski agradeço por me inspirar a ser uma profissional capacitada, com bom senso em todas as situações! Marciane, graças a todas as oportunidades que você me abriu na carreira, muitas coisas excelentes aconteceram na profissão e na vida pessoal. Nunca terei palavras suficientes para agradecer o apoio e confiança incondicional que você depositou em mim durante os nossos quase 10 anos juntas na FCA. Você moldou o meu caráter e permitiu os meus sonhos atuais e com certeza futuros se realizarem. Você é muito mais que apenas uma orientadora para mim!! Aos professores Márcio Torsoni, Adriana Torsoni e Letícia Souza eu agradeço a oportunidade de fazer parte da família LabDime desde a sua criação e ter construído tantos momentos de aprendizado e alegria ao longo desses anos. Aos queridos colegas do LabDime (TODOS) agradeço a oportunidade de aprender um pouquinho com cada um nos últimos anos. Agradeço o imenso cuidado e carinho comigo. Josi, obrigada por sempre me apoiar e organizar tudo no laboratório!! Você é demais!

À Bia, minha querida aluna de iniciação científica que me acompanha, eu tenho muito a agradecer. Bia, eu agradeço a amizade, a confiança em aprender comigo e principalmente todo o trabalho em me auxiliar em muitos dos experimentos contidos nesta tese!

Às minhas amigas, prima-irmãs de coração e alma Karina Grigolon, Thaís de Fante e Fernanda Gonçalves eu agradeço por serem o meu porto seguro nas quedas e vitórias! Graças ao apoio incondicional e companhia de vocês no dia a dia eu tenho excelentes momentos felizes e marcados na memória! Eu amo vocês!

Sou grata também as coincidências da vida que permitem os encontros e reencontros..... Graças a uma dessas coincidências neste último ano que se passou eu ganhei um querido amigo! Vitor Virginio foi excelente viver a jornada de último ano de doutorado compartilhada com você! A sua companhia e amizade na ciência e fora dela se tornaram essenciais em minha vida!!!E espero que isso continue mesmo com você longe em seu novo ciclo agora!

À minha mãe Cidinha, ao meu pai Gerson e aos meus tio Silvio e Walter eu agradeço por serem a base da minha vida! Graças a vocês eu estou amparada emocionalmente em todos os momentos da minha bela vida! Amo vocês!

Ao órgão de Fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp processo 2015/ 25710-6) eu agradeço o suporte financeiro para a realização dessa e outras pesquisas em nosso laboratório.

Obrigada!!!

EPIGRAFE:

"Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode não ser o bastante. Dê o melhor de você assim mesmo. Veja você que, no final das contas, é tudo entre você e Deus. Nunca foi entre você e os outros!"

(Parte do texto "Assim mesmo", atribuído à Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO:

A autofagia é um processo de degradação lisossomal que mantém a viabilidade celular ao degradar, por exemplo, organelas senescentes e agregados proteicos. Alterações na atividade da autofagia parecem romper a homeostasia no controle do balanço energético hipotalâmico bem como prejuízo à atividade neuronal. Neste trabalho, o nosso objetivo foi investigar a relação entre lipídeos e modulação de autofagia neuronal. Para tanto, inicialmente utilizamos modelo de exposição aguda a dieta hiperlipídica (HFD) durante 1 e 3 dias. Nessas condições encontramos que a dieta é capaz de alterar parâmetros metabólicos e inflamatórios dos camundongos, associados a alterações conteúdo de transcrito de marcadores de autofagia no tecido hipotalâmico. Apesar disso, a atividade global de autofagia parece estar preservada, visto que não foi possível observar diferença estatística no conteúdo proteico de importantes marcadores do processo em relação ao controle. Avaliamos também o efeito do uso intracerebroventricular (i.c.v) de palmitato (PA), importante ácido graxo saturado. Novamente, encontramos apenas alterações no conteúdo de transcrito dos marcadores de autofagia. Finalmente, em cultura de neurônios hipotalâmicos imortalizados que expressam *Npy/AgRP*, encontramos que o PA caracterizou-se como importante indutor da atividade de autofagia, associado a perturbações na viabilidade celular. Não houve indução no processo autofágico quando utilizamos uma mistura de ácidos graxos contendo representantes saturados e insaturados. Além disso, o ácido graxo palmitoleico (PO), importante ácido graxo insaturado que possui o mesmo número de carbonos do que o palmitato, foi capaz de diminuir a atividade de autofagia nos neurônios. Ao realizar um co-tratamento entre PA combinado com PO, encontramos que a autofagia induzida em resposta ao PA foi atenuada. O mesmo efeito foi encontrado quando realizamos o pré-tratamento com a droga miriocina, importante inibidor da síntese de *de novo* ceramidas. Avaliamos também a influência da via de TLR4 na indução de autofagia em resposta ao PA por meio do bloqueio do receptor pelo uso da droga TAK242. Encontramos que nessas condições o PA permaneceu induzindo a autofagia, independente do uso ou não da droga. Assim, concluímos nesse trabalho que o grau de saturação da cadeia de ácidos graxos parece ser responsável por diferentes perfis de modulação de autofagia neuronal, sendo que a síntese de *de novo* ceramidas parece ser importante alvo promissor relacionado a ativação de autofagia em resposta ao palmitato. O estabelecimento da relação entre lipídios dietéticos e modulação de autofagia em neurônios que controlam a ingestão alimentar pode representar importante passo na identificação de alvos terapêuticos para o controle da obesidade.

ABSTRACT:

Autophagy is a lysosomal degradation pathway that helps cells to sustain viability by degrading, for example, senescent organelles and protein aggregates. Alterations in autophagy activity in the hypothalamus tissue seems to disrupt energy balance control as well as impairing neuronal activity. In this work, our objective was to investigate the relationship between lipids and neuronal autophagy modulation. Therefore, we initially used an acute exposure model by feeding animals with high fat diet (HFD) for 1 and 3 days. Under these conditions we found that the diet is capable of altering metabolic and inflammatory parameters of mice, associated with alterations in gene expression of autophagy markers in hypothalamic tissue. Nevertheless, the global autophagy activity seems to be preserved, since it was not possible to observe statistical difference in the protein content of important process markers. We also evaluated the effect of palmitate (PA) intracerebroventricular (i.c.v) treatment, an important saturated fatty acid. Again, we found only alterations in gene expression of autophagy markers. Finally, using culture of immortalized hypothalamic neurons expressing *Npy / AgRP*, we found that palmitate was characterized as an important inducer of autophagy activity, associated with disturbances in cell viability. Interestingly, there was no induction in the autophagic process when we used a mixture containing saturated and unsaturated fatty acids. In addition, palmitoleic (PO) fatty acid, an important unsaturated fatty acid that has the same number of carbons as PA, was able to decrease autophagy activity in neurons. When we performed a co-treatment between PA combined with PO, we found that the PA-induced autophagy was attenuated. The same effect was found when we pretreated the neurons with the drug myriocin, an important inhibitor of *de novo* ceramide synthesis. We also evaluated the influence of the TLR4 pathway on induction of autophagy in response to PA by blocking the receptor with the commercial drug TAK242. We found that under these conditions, PA remained inducing autophagy. Thus, we conclude in this work that the saturation of lipids chain seems to be responsible for different neuronal autophagy modulation profiles with and ceramide synthesis being an important promising target. The establishment of the relationship between dietary lipids and autophagy modulation in neurons that control food intake may represent an important step in identifying therapeutic targets for obesity control.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

AgRP- Peptídeo relacionado ao *agouti*

AKT- Proteína quinase B

AMPK- Proteína quinase ativada por AMP

ARC- Núcleo arqueado

Atgs- *Autophagy related genes*

BCN- Beclin-1

CART- Peptídeo regulado por cocaína e anfetamina

CCK- Colecistocinina

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CMA- Autofagia mediada por chaperonas

DAMPS- Padrões moleculares associados a danos

GLP1- Peptídeo Semelhante ao Glucagon- 1

HFD- Dieta hiperlipídica

DMN- Núcleo dorsomedial

ERE- Estresse de retículo endoplasmático

eGLP-2 -Peptídeo Semelhante ao Glucagon-2

I.c.v- Intracerebroventricular

IL-1 β - Interleucina 1 'beta'

IL6- Interleucina 6

iNOS ou NOS2- Óxido nítrico sintase 2

I κ B- Inibidor kappa B

Lamp- *Lysosome-associated membrane protein*

LC3- *Microtubule-associated protein 1 light chain 3*

LHA- Área hipotalâmica lateral

LIR- Domínio de ligação com LC3

mTORC1- *Mammalian target of rapamycin (serine/threonine kinase) 1*

NEFA- Mistura de ácidos graxos

NPY- Neuropeptídeo Y

PA- Palmitato

PI3- Fosfatidilinositol de classe 3

PI- Iodeto de propídeo

PO- Palmitoleico

POF- Pesquisa de orçamentos familiares

p62 ou SQSTM- *sequestosome 1*

POMC- Pro-opiomelancortina

pS6- *Ribosomal protein S6*

PRRs- "*Pattern-recognition receptors*"

PVN- Núcleo paraventricular

Rab7- *Ras-related protein*

SCD1- *esteoril-Coa-dessaturase*

SPT- *serine palmitoyl transferase*

TFEB- Fator de transcrição EB

TLR4- *Toll-like receptor 4*

TNF α - Fator de necrose tumoral 'alfa'

UBA- Domínio de ligação com proteínas ubiquitinadas

ULK1- Proteína treonina-serina quinase 1

VIGITEL- Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

VMN- Núcleo ventromedial

Vps34- *phosphatidylinositol 3-kinase*

LISTA DE FIGURAS:

Figura 01. Papel intracelular do palmitato (PA) e palmitoleico (PO)	22
Figura 02. Etapas da macroautofagia	23
Figura 03. Sinais envolvidos na indução da macroautofagia em resposta à disponibilidade de nutrientes.....	24
Figura 04. Parâmetros metabólicos após curta exposição à HFD	34
Figura 05. Modulação de autofagia hipotalâmica após curta exposição à HFD	35
Figura 06. Modulação de autofagia em resposta ao tratamento com palmitato intracerebroventricular.....	36
Figura 07. O papel da autofagia em linhagem de neurônios hipotalâmicos	37
Figura 08. Viabilidade celular na linhagem GT1-7	39
Figura 09. Viabilidade celular na linhagem mHypoE-46	40
Figura 10. Viabilidade celular na linhagem mHypoA 2/29	41
Figura 11. Avaliação da expressão gênica após o tratamento com palmitato na linhagem mHypoE-46	42
Figura 12. Avaliação da expressão gênica após o tratamento com palmitato na linhagem mHypoA-2/29	43
Figura 13. Avaliação do conteúdo proteico de marcadores de autofagia na linhagem mHypoA- 2/29	45
Figura 14. Avaliação do conteúdo proteico de marcadores de autofagia na linhagem mHypoE- 46	46
Figura 15. Avaliação do conteúdo proteico de marcadores de autofagia na linhagem mHypoA NYP/GFP	46
Figura 16. Uso de bafilomicina A1 para investigação do fluxo de autofagia em linhagem de neurônios hipotalâmicos	47
Figura 17. Padronização da modulação de autofagia em linhagem de neurônios hipotalâmicos	48
Figura 18. Avaliação da autofagia por citometria de fluxo na linhagem GT1-7.....	49

Figura 19. Avaliação da autofagia por citometria de fluxo na linhagem mHypoA 2-29...	50
Figura 20. Avaliação da autofagia por citometria de fluxo na linhagem mHypoE-46.....	51
Figura 21. Avaliação da expressão gênica após o tratamento com palmitato combinado a citocinas TNF α /IFN (10 ng/ mL cada) nas linhagens mHypoA 2/29 e mHypoE-46.....	52
Figura 22. Características das linhagens após o tratamento com palmitato combinado ou não com TNF- α IFN- γ	53
Figura 23. Meio condicionado da linhagem BV-2 tratada com palmitato (100 μ M) na linhagem de neurônios mHypoA 2/29	54
Figura 24. Avaliação do efeito da mistura de ácidos graxos na modulação de autofagia em neurônios hipotalâmicos	55
Figura 25. Avaliação do efeito da mistura de ácidos graxos na modulação de autofagia em neurônios hipotalâmicos	56
Figura 26. Avaliação do conteúdo proteico de p-AMPK <i>in vitro</i>	57
Figura 27. Avaliação do conteúdo proteico de p-AMPK após curta exposição à dieta.....	57
Figura 28. Teste moduladores AMPK em linhagens de neurônios hipotalâmicos.....	58
Figura 29. Modulação de autofagia em resposta ao tratamento com LPS em células GT1-7	59
Figura 30. Expressão gênica após o uso de TAK 242, importante inibidor do receptor TLR4	60
Figura 31. Uso do inibidor TAK-242 para investigar o envolvimento do receptor TLR4 na modulação de autofagia em neurônios hipotalâmicos	61
Figura 32. Expressão gênica de enzimas envolvidas na síntese de <i>de novo</i> ceramidas.	63
Figura 33. Uso de droga miriocina (10 μ M) para inibição da síntese de <i>de novo</i> ceramidas e investigação da modulação de autofagia em neurônios hipotalâmicos.	64

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 O papel dos ácidos graxos saturados na injúria hipotalâmica	18
1.2 Autofagia: formação do autofagossomo e reciclagem do conteúdo	22
1.3 O papel da autofagia na homeostasia neuronal e ingestão alimentar	26
2. OBJETIVOS	28
3. MÉTODOS	28
3.1 Aspectos éticos	28
3.2 Implante de cânulas no hipotálamo	29
3.3 Curta exposição à dieta hiperlipídica.....	29
3.4 Dissecção do hipotálamo e Western Blot	30
3.5 Real Time PCR das amostras de tecido hipotalâmico.....	31
3.6 Condições de cultivo e tratamento das linhagens celulares	32
3.7 Extração de proteínas e RTq-PCR das culturas das linhagens celulares	32
3.8 Citometria de fluxo das linhagens de neurônios hipotalâmicos	32
3.9 Análise estatística	33
4. RESULTADOS	33
4.1 O tratamento agudo com lipídios não altera a atividade global de autofagia no tecido hipotalâmico de camundongos da linhagem Swiss.....	33
4.2 O papel do palmitato na autofagia hipotalâmica após tratamento intracerebroventricular (i.c.v).....	35
4.3 O papel da autofagia na homeostasia de neurônios hipotalâmicos.....	37
4.4 O palmitato altera a viabilidade celular em linhagens de neurônios hipotalâmicos..	38

4.5 O perfil de expressão gênica em resposta ao tratamento com palmitato em linhagens de neurônios hipotalâmicos	41
4.7 Modulação de autofagia detectada por citometria de fluxo em linhagens de neurônios hipotalâmicos	47
4.8 Avaliação do efeito de fatores inflamatórios na modulação de autofagia em linhagens de neurônios hipotalâmicos	51
4.9 Avaliação da modulação de autofagia em resposta ao tratamento com mistura de ácidos graxos saturados e insaturados	54
4.10 Avaliação da modulação de autofagia em resposta ao tratamento com palmitoleico (PO)	55
4.11 Investigação do envolvimento da proteína AMPK na modulação de autofagia hipotalâmica	56
4.12 Investigação do envolvimento do receptor TLR4 na modulação de autofagia em resposta ao palmitato em linhagens de neurônios hipotalâmicos	58
4.13 Investigação do envolvimento da síntese de de novo ceramidas na modulação de autofagia em resposta ao palmitato em linhagens de neurônios hipotalâmicos	61
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO:

O estilo de vida contemporâneo, oriundo do desenvolvimento econômico-tecnológico, alterou drasticamente o modo de viver da sociedade bem como sua relação com a natureza, resultando em rápida transição demográfica, epidemiológica e nutricional (Ahima et al., 2011). Neste sentido, a obesidade representa um dos mais importantes problemas de saúde na atualidade, sendo capaz de afetar pessoas em diferentes idades e países ao redor do globo. Dados recentes apontam que, pela primeira vez na história, o número de pessoas com sobrepeso e obesidade ultrapassa o número de pessoas magras (Maffetone et al., 2017).

No Brasil essa situação não é diferente, uma vez que a composição corporal da população reflete a tendência mundial de sobrepeso e obesidade. Segundo um levantamento realizado pela vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL), em 2018, a taxa de obesidade no país passou de 11,8% para 19,8%, entre os anos de 2006 e 2018. Isso representa um aumento de 67% no número de casos (Brasil, 2018).

O consumo de dietas hipercalóricas, ricas em gordura saturada, carboidrato simples e altamente palatáveis, associado ao sedentarismo e fatores epigenéticos e genéticos são determinantes para a alta prevalência de casos de sobrepeso/obesidade e outras doenças crônicas (Galgani & Ravussin, 2008). Acredita-se que o desequilíbrio na ingestão de ácidos graxos saturados e insaturados seja fator importante para o comprometimento da homeostasia energética, refletindo-se nos impactantes dados epidemiológicos vistos hoje na sociedade

Dados brasileiros de consumo alimentar contidos na Pesquisa de Orçamentos Familiares- POF (2008-2009), comparada à mesma pesquisa realizada em 2002-2003, exemplificam a alteração nos padrões de escolha/seleção de alimentos por famílias com médio e alto poder aquisitivo. Por exemplo, o consumo de alimentos processados esteve em evidência no período abrangido pela pesquisa, sendo que alguns alimentos analisados merecem destaque como o aumento na ingestão de embutidos (de 1,78% para 2,2%), biscoitos (de 3,1% para 3,4%), refrigerantes (de 1,5% para 1,8%) e refeições prontas (de 3,3% para 4,6%) (IBGE, 2010).

Apesar da importância em funções estruturais e energéticas, conforme destacado, o excesso no consumo de ácidos graxos saturados representa riscos à saúde humana. A gordura saturada (com destaque para os ácidos graxos láurico, mirístico, esteárico e palmítico) é capaz de aumentar a concentração sérica de colesterol, especialmente o mirístico, enquanto o esteárico parece ser neutro em seus efeitos sobre o colesterol (Daumerie et al., 1992; Kris- Etherton et al., 1997). Pesquisas recentes evidenciaram a importância na qualidade das fontes lipídicas para

a dieta e seus efeitos à saúde ao constatarem que a substituição de 5% do valor energético de ácidos graxos saturados por ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados na dieta humana resultou em declínio de taxas de mortalidade (Dong et al., 2016).

Dessa forma, o interesse acerca do papel metabólico dos lipídios cresceu nas últimas décadas. A ação do excesso de ácidos graxos saturados como molécula sinalizadora em diversos tecidos é determinante para o comprometimento de vias de sinalização intracelular, perturbando a regulação do peso corporal. Para o controle energético, uma área cerebral é particularmente importante: o hipotálamo.

1.1 O papel dos ácidos graxos saturados na injúria hipotalâmica

O balanço energético corporal é finamente regulado *via* comunicação bidirecional entre o cérebro e os órgãos periféricos. Especificamente, o hipotálamo representa uma pequena região presente na base do sistema nervoso central que contém múltiplos núcleos distintos. Em especial, em relação aos núcleos que controlam a ingestão alimentar e o balanço energético, destacam-se as seguintes áreas: núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN), núcleo ventromedial (VMN), núcleo dorsomedial (DMN) e área hipotalâmica ventrolateral (VLH) (Schwartz et al., 2000). Cada população neuronal presente no hipotálamo apresenta especificidade em relação ao perfil de neuropeptídeos, neurotransmissores e receptores, possibilitando a execução de importantes funções no organismo como sono, sede, termoregulação, ingestão alimentar e gasto energético (Velloso et al., 2009; Araújo et al., 2010; Le Thuc et al., 2017).

O conhecimento do hipotálamo como um centro regulador da ingestão alimentar emergiu a partir de experimentos na década de 60 em que núcleos específicos na região hipotalâmica foram lesionados e suas consequências avaliadas. Por exemplo, ao lesionar o VMN em ratos, os cientistas encontraram que a ingestão alimentar foi aumentada significativamente, enquanto a lesão na região VLH apresentou efeito oposto (redução na ingestão alimentar) (Everitt, 1990; Bouret, 2017).

Em adição, a região do ARC no hipotálamo merece destaque para as funções de controle de ingestão alimentar, balanço energético e metabolismo já que é altamente responsiva aos sinais referentes ao estado energético devido à proximidade ao terceiro ventrículo (Elmqvist et al., 2005; Velloso, 2009). Na região do ARC são encontradas duas grandes populações neuronais essenciais para a homeostasia no balanço energético. Sabe-se que a deleção de neurônios que expressam *Npy* (neuropeptídeo Y) e co-expressam *AgRP* (peptídeo relacionado

ao *agouti*) resulta em hipofagia e perda de peso enquanto que a deleção de neurônios que expressam *POMC* (pro-opiomelancortina) e *CART* (Peptídeo regulado por cocaína e anfetamina) promove efeito reverso (Schwartz et al., 2000; Flier, 2004; Velloso, 2009; Araújo et al., 2010)

Ambas as populações neuronais (*Npy/AgRP* e *POMC/CART*) expressam receptores alvos para hormônios secretados em quantidades proporcionais à adiposidade, como a leptina (secretada pelo tecido adiposo e que desempenha importante papel no controle da saciedade); a insulina (outro hormônio essencial para a saciedade que é secretado pelas células beta-pancreáticas); bem como hormônios secretados pelo trato gastrointestinal como a colecistocinina (*CCK*), *GLP-1* (Peptídeo Semelhante ao Glucagon-1) e *GLP-2* (Peptídeo Semelhante ao Glucagon-2) (Elmqvist et al., 2005; Le Thuc et al., 2017).

Os sinais para estímulo ou diminuição na ingestão alimentar oscilam frente a capacidade de ativação das populações neuronais presentes no ARC em resposta aos hormônios circulantes. Durante a ingestão alimentar os nutrientes são digeridos e absorvidos resultando no estímulo dos sinais de saciedade e adiposidade. Neste momento, alguns hormônios como *CCK*, *GLP-1*, *GLP-2*, insulina e leptina atingem a circulação (Fonseca-Alaniz et al., 2007). O aumento nos níveis circulantes desses hormônios estimula os neurônios anorexígenos *POMC* e *CART*, resultando na indução de sinais de saciedade e aumento na termogênese. Em contrapartida, durante o jejum ocorre o inverso, a diminuição nos níveis circulantes de insulina e leptina resulta na ativação de neurônios *Npy* e *AgRP* responsáveis por estimular a ingestão alimentar e diminuir a termogênese. (Schwartz et al., 2000; Flier, 2004; Velloso, 2009; Araújo et al., 2010).

No entanto, situações como a obesidade podem prejudicar o controle do balanço energético devido ao papel dos ácidos graxos como sinalizadores intracelulares. Assim, o excesso e desequilíbrio na ingestão de lipídios pode exceder a capacidade de estoque do tecido adiposo, induzindo ao acúmulo em outros tecidos sendo este quadro denominado lipotoxicidade.

Durante muitos anos, o acúmulo de lipídios em órgãos periféricos foi alvo de interesse no entendimento da fisiopatologia de doenças metabólicas em nossa sociedade, sendo que, mais recentemente, foi demonstrado que similar ao que acontece nos tecidos periféricos, o hipotálamo parece ser também alvo da lipotoxicidade. Isso é capaz de exacerbar a injúria neuronal comumente encontrada na obesidade (Martínez de Morentin et al., 2010; Thaler et al., 2012, Ertunc & Hotamisligil, 2016). Por exemplo, Thaler e colaboradores (2012) encontraram aumento no nível de palmitato no hipotálamo de camundongos submetidos à ingestão de HFD por quatro semanas.

O palmitato ou ácido palmítico (16:0, PA) é o ácido graxo saturado mais comumente encontrado no organismo humano, sendo fornecido pela dieta ou sintetizado endogenamente a partir de outros ácidos graxos, carboidratos ou aminoácidos (Ertunc & Hotamisligil, 2016; Carta et al., 2017). Os níveis de PA representam cerca de 20-30% do total de ácidos graxos da membrana fosfolipídica e das moléculas de triacilglicerol encontradas no tecido adiposo (Ertunc & Hotamisligil, 2016; Carta et al., 2017). Conforme sugerido pela nomenclatura, o palmitato é o ácido graxo de maior quantidade no óleo de palma (44% dos lipídios totais), sendo que quantidades significativas de PA também podem ser encontradas em carnes e produtos lácteos e seus derivados (50-60% do total de lipídios), bem como óleo de coco (26% do total de lipídios). Assim, a média de ingestão diária representa cerca de 20-30 gramas/dia, ou aproximadamente 8-10% da energia total diária (Carta et al., 2015; Carta et al., 2017).

Por outro lado, o palmitoleico (PO) é um ácido graxo monoinsaturado ômega 7 de dezesseis carbonos produzido endogenamente em células como adipócitos e hepatócitos como resultado da dessaturação do palmitato, processo este catalizado pela enzima *estearyl-CoA-dessaturase* (SCD-1) (Cao et al., 2008). Estudos *in vitro* e *in vivo* (roedores e humanos) encontraram que o PO possui ações importantes no músculo esquelético e fígado ao aumentar a captação de glicose e sensibilidade à insulina, bem como atuar na redução da esteatose hepática (Dimopoulos et al., 2006; Stefan et al., 2010; Yang et al., 2011). Interessante, o PO parece ser capaz de bloquear os efeitos deletérios do palmitato no metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina em células musculares (Dimopoulos et al., 2006).

Os mecanismos subjacentes aos efeitos nocivos do excesso de fluxo lipídico saturado estão relacionados a inúmeros fatores como alterações em propriedades biofísicas de organelas celulares, alterações em vias de sinalizações responsivas a hormônios bem como influência positiva na ativação de vias inflamatórias (Ertunc & Hotamisligil, 2016). De fato, os ácidos graxos saturados de cadeia longa presentes na dieta são capazes de interagir de forma direta com receptores da imunidade inata conhecidos como TLRs (*Toll Like Receptors*) (Milanski et al., 2009; Mayer & Belsham, 2010).

Toll-like receptors (TLRs) compreendem o maior grupo de receptores PRRs (*pattern-recognition receptors*) responsáveis pela detecção de diversos padrões moleculares associados a patógenos (“PAMPs”- *pathogen-associated molecular patterns*), essenciais para a sobrevivência dos microrganismos, além de reconhecerem também moléculas endógenas liberadas de células hospedeiras que morreram após stress celular ou lesão tecidual, conhecidas como padrões moleculares associados a danos (“DAMPs”). Atualmente 13 tipos de TLRs foram identificados em células de mamíferos e destes TLR1 a TLR10, encontram-se expressos

em células humanas (Aderem & Ulevitch, 2000; Kumar et al., 2011). No contexto da obesidade, a ativação do receptor TLR4 em resposta à dieta HFD é determinante para a injúria neuronal devido ao aumento na expressão local de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Milanski et al., 2009; Mayer & Belsham, 2010).

Outro ponto importante resultante do acúmulo ectópico de lipídios se refere ao metabolismo de esfingolipídios. Por exemplo, o acúmulo de palmitato induz a biossíntese de ceramidas, que por sua vez também podem ativar vias inflamatórias e inibir a ação do hormônio insulina em diversos tecidos. As ceramidas são uma família de moléculas lipídicas, precursoras de todos os esfingolipídios complexos, cujo papel principal é mediar diferentes eventos patofisiológicos celulares incluindo crescimento, diferenciação, ciclo celular, senescência e apoptose (Chiara Mencarelli & Pilar Martinez-Martinez, 2012). A inibição da síntese de ceramidas, pelo uso de uma droga denominada miriocina, resultou em melhor tolerância a glicose, bem como melhorou a sensibilidade ao hormônio insulina em tecidos como fígado e músculo de modelos de camundongos com obesidade induzida por HFD (Yang et al., 2009).

No sistema nervoso central, os níveis intracelulares de ceramida e esfingolipídios são regulados de modo preciso já que alterações contribuem para diversos distúrbios neurológicos associados a inflamação, incluindo doenças neurodegenerativas (Filippov et al., 2012; González-García et al., 2017). O uso de ceramidas exógenas para a investigação de seu papel na homeostasia de neurônios hipotalâmicos resultou na indução de lipotoxicidade, estresse de retículo bem como alterações na termogênese do tecido adiposo marrom (Contreras et al., 2014), reafirmando a importância do controle nos níveis de ceramidas para o balanço energético hipotalâmico e suas interações com órgãos periféricos.

Diante a tais evidências, é possível perceber uma importante relação entre lipotoxicidade e inflamação, sendo que ambos os mecanismos se retroalimentam (Figura 01). Isso, é capaz de criar ciclos patológicos viciosos que contribuem para a dificuldade nas ações terapêuticas de controle da obesidade e doenças associadas. Assim, o aumento no número de casos de obesidade na população mundial ainda não está controlado.

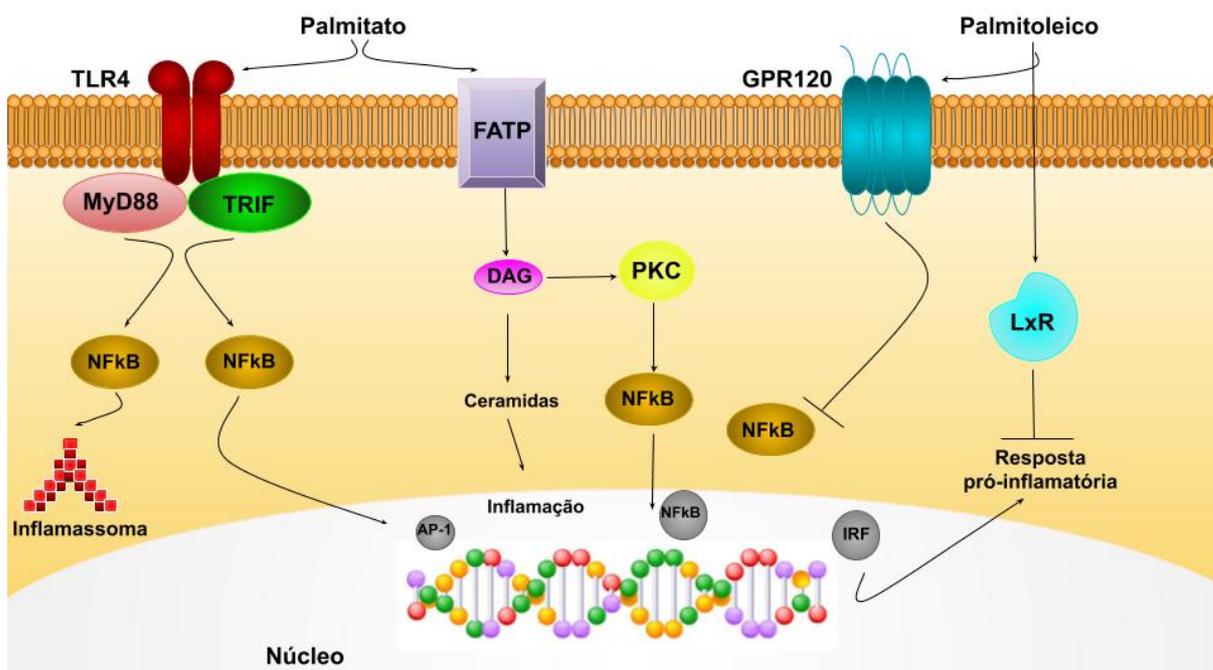


Figura 01. Papel intracelular do palmitato (PA) e palmitoleico (PO). Adaptado: Ertunc & Hotamisligil, 2016

Além dos mecanismos acima descritos, os avanços nos conhecimentos científicos acerca da injúria neuronal nos últimos anos vêm descrevendo que sistemas de degradação e limpeza celular como a autofagia celular e o sistema ubiquitina proteassoma estão envolvidos no controle hipotalâmico da ingestão alimentar e gasto energético. Destacamos aqui o importante papel da autofagia celular para a sobrevivência neuronal e manutenção do peso corporal (Mizushima & Komatsu, 2011).

1.2 Autofagia: formação do autofagossomo e reciclagem do conteúdo

O termo autofagia foi primeiramente definido pelo pesquisador Cristian de Duve há mais de 50 anos quando o mesmo foi ganhador do prêmio Nobel pela descoberta dos lisossomos. Os lisossomos são organelas responsáveis pela maior parte da degradação celular nos organismos eucarióticos, sendo que essa degradação é feita por três vias distintas: fagocitose, endocitose e autofagia (De Duve, 1966; Glick et al., 2010). Recentemente, o pesquisador Yoshinori Oshumi também ganhou um prêmio Nobel resultante de sua pesquisa com autofagia e os mecanismos que levam a sua indução.

A autofagia compreende um heterogêneo grupo de vias celulares que em células eucarióticas permitem a entrega de componentes citoplasmáticos para a degradação lisossomal.

Para tanto, a autofagia é um mecanismo altamente induzível em situações de privação de nutrientes, bem como após estresse ou injúria, atuando como um sistema de controle de qualidade celular devido à capacidade de remoção de células danificadas, proteínas de longa vida e agentes patogênicos (Klionsky, 2005; Glick et al., 2010). Atualmente, a via canônica de autofagia compreende três formas distintas que são classificadas com base nas funções fisiológicas e modo de entrega do alvo a ser degradado ao lisossomo. São elas: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (CMA) (Schneider & Cuervo, 2014). No presente estudo investigamos a influência de lipídios na macroautofagia.

A macroautofagia é responsável por mais de 90% da autofagia celular, sendo por isso a forma mais estudada e conhecida (Behrends et al., 2010). Nela há a formação de uma dupla membrana de 0.5-1.5 μm conhecida por autofagossomo, que circunda o conteúdo a ser degradado, o qual posteriormente se fundirá ao lisossomo formando a estrutura denominada autofagolisossomo. No autofagolisossomo as proteínas, organelas, lipídios ou patógenos são degradados pelas enzimas lisossomais (Ravikumar et al., 2010; Glick et al., 2010; Mizushima & Komatsu, 2011) (Figura 02). Dependendo do tipo de conteúdo a ser degradado, a macroautofagia apresenta denominações secundárias como: lipofagia, xenofagia, ribofagia, entre outros (Jaishy & Abel, 2016).

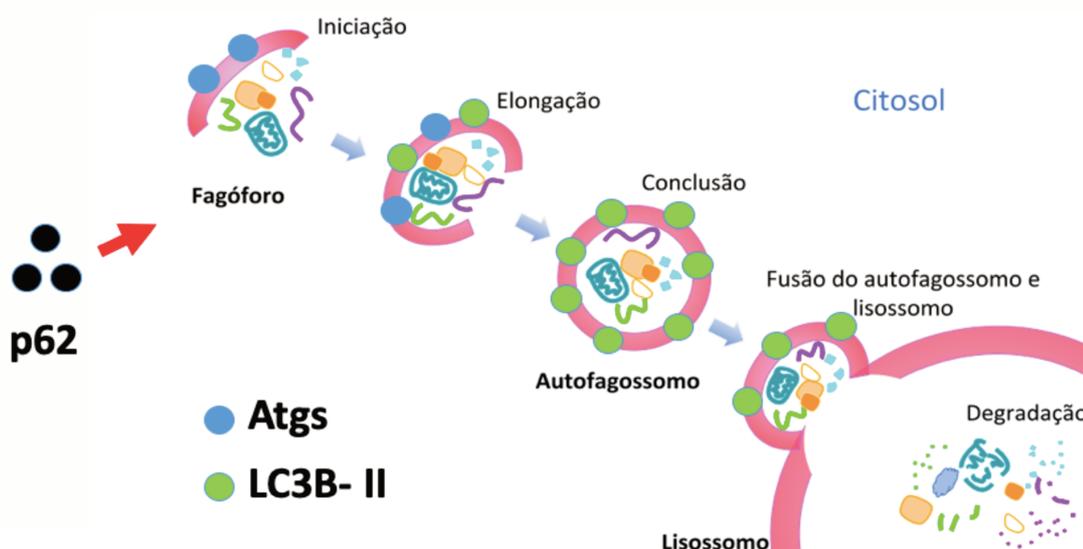


Figura 02. Etapas da macroautofagia celular. Adaptado: Mizushima & Komatsu, 2011

A macroautofagia, a partir desse ponto no texto referenciada apenas como autofagia, é controlada por um grupo de genes evolutivamente conservados (genes ATG) que atuam de modo coordenado para a indução, nucleação e alongamento de vesículas autofágicas além de

sua fusão com os lisossomos para posterior quebra e reciclagem do material digerido (Yord et al., 2012). Pelo menos 11 genes ATG foram identificados em mamíferos (ATG1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 16), sendo que o tempo necessário para a formação da vesícula autofágica parece ser em torno de 5-10 minutos (Jaishy & Abel, 2016).

Os sinais capazes de levar à indução de autofagia ainda não estão completamente elucidados (Klionsky, 2005). No entanto, classicamente a via autofágica é ativada pelo aumento nos níveis circulantes de glucagon ou depleção de aminoácidos durante a inanição, porém é inibida por aminoácidos e insulina por meio da regulação negativa exercida pelo complexo mTORC1 e AKT, após a ingestão alimentar (Arsham, 2006). Assim a atividade autofágica flutua conforme os períodos de ingestão alimentar e inanição (Arsham, 2006), sendo que os níveis intracelulares de nutrientes como os aminoácidos e glicose podem também atuar diretamente na transcrição de genes Atgs ou serem induzidos pelo aumento nos níveis de AMPK (proteína quinase ativada por AMP) (Kim & Lee, 2014).

A formação da estrutura do autofagossomo requer ação complexa e concisa das proteínas Atgs (Kim & Lee, 2014). Durante a indução, os níveis de AMPK atuam diretamente na inibição de mTORC1 que deixa de fosforilar a proteína treonina-serina quinase 1 (ULK1) e dissocia-se desse complexo. No entanto, essa dissociação sozinha não é capaz de induzir a ativação da maquinaria autofágica. Para isso, a proteína ULK1 é diretamente ativada pelo aumento nos níveis de AMPK. Além disso, o complexo mTORC1 também pode interagir com o fator de transcrição que controla a biogênese de autofagossomos e lisossomos denominado TFEB (fator de transcrição EB), prevenindo a sua translocação nuclear e programação dos genes autofágicos (Jaishy & Abel, 2016) (Figura 03). A AMPK pode atuar na indução de autofagia via FoxO3, que por sua vez controla genes autofágicos essenciais.

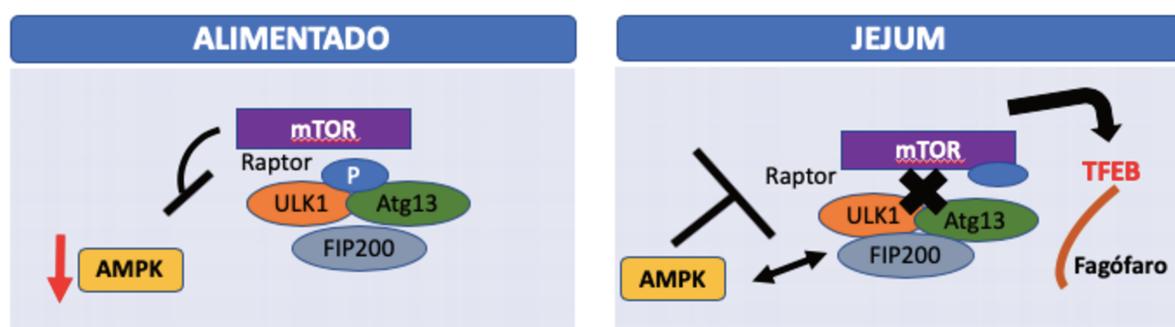


Figura 03. Sinais envolvidos na indução da macroautofagia em resposta a disponibilidade de nutrientes. Adaptado: Singh & Cuervo, 2011.

Em continuidade, a proteína ULK1 recruta o complexo Beclin-1/ Vps34 por meio da

fosforilação da proteína Ambra1. A enzima VPS34 é a única em mamíferos com capacidade para atuar na fosforilação do substrato PI (fosfatidilinositol) na posição D3, gerando PI3P para a nucleação e crescimento do fagóforo (a porção inicial da membrana do autofagossomo). Além disso, a produção e acúmulo de PI3P é essencial para a liberação de Beclin-1 da sua ligação com a proteína anti-apoptótica Bcl2 (Mizushima & Komatsu, 2011; Kim & Lee, 2014).

A expansão do fagóforo é mediada pelas proteínas Atgs em dois sistemas principais de conjugação com reações enzimáticas similares a ubiquitinação de proteínas. Inicialmente, Atg12 é conjugada à Atg5 por meio da ação de Atg7 (que age como uma enzima de ativação semelhante a E1) e Atg10 (que age como uma enzima de conjugação semelhante a E2). Posteriormente, o conjugado Atg12- Atg5 se liga à Atg16L para formar o complexo Atg12-Atg5-Atg16L que participa da conjugação de LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) (Fujita *et al.*, 2008). A proteína LC3, gerada a partir da proteína pró-LC3 citosólica pela ação da protease Atg4, é conjugada a fosfatidiletanolamida por meio da ação de Atg3, Atg7 e do complexo Atg12-Atg5-Atg16L. Depois da conjugação, LC3- PE ou LC3-II localiza-se na membrana do autofagossomo e participa da expansão do mesmo, correlacionando-se diretamente com o número de autofagossomos formados, o que a coloca como um dos 10 principais marcadores de atividade de autofagia celular. Após o término na formação da estrutura do autofagossomo, o complexo Atg12-Atg5-Atg16L é desfeito e separa-se da vesícula (Fujita *et al.*, 2008; Mizushima & Komatsu, 2011).

Os componentes celulares alvos para a degradação autofágica são reconhecidos e transportados para a degradação por meio de proteínas adaptadoras responsáveis pela conexão entre essas duas etapas. A primeira proteína com função adaptadora identificada foi a proteína p62 (SQSTM1), que apresenta seis domínios conhecidos e necessários para a interação com a maquinaria autofágica e outras vias de sinalização. Especificamente em relação a maquinaria autofágica, dois domínios da proteína p62 se destacam: o domínio UBA (domínio de ligação com proteínas ubiquitinadas) que se liga aos alvos de degradação e o domínio LIR (domínio de ligação com LC3), responsável por entregar os alvos à degradação (Maloney *et al.*, 2003). Estudos mostraram que os níveis de p62 geralmente são inversamente correlacionados com a degradação de autofagia, sendo que a perda de genes Atgs ou outros fatores requeridos para a fusão do autofagossomo com o lisossomo resultam em acúmulo de agregados marcados por p62 (Maloney *et al.*, 2003).

Uma característica presente nos três tipos de autofagia conhecidos é a convergência com o lisossomo. Recentemente foi descoberto ainda que antes da fusão com os lisossomos, o autofagossomo pode se fundir com vesículas como endossomos (precoces ou tardios)

resultando em estruturas denominadas *amphiossomes*. Os autofagossomos são amplamente distribuídos no citoplasma e para que essas vesículas se fundam com o lisossomo a cascata de sinalização intracelular de autofagia deve permanecer em alto nível de eficiência. Assim, o autofagossomo ou *amphiossome* pode se fundir ao lisossomo de modo dependente da presença da proteína de membrana lisossomal LAMP2, formando o autofagolisossomo. Neste momento, as enzimas lisossomais proporcionam o ambiente de degradação e reciclagem do conteúdo entregue (Mizushima & Komatsu, 2011) (Figura 02).

1.3 O papel da autofagia na homeostasia neuronal e ingestão alimentar

Os neurônios são altamente dependentes do processo autofágico para manter a homeostasia celular e protease devido a sua alta capacidade de limpeza de proteínas malformadas ou danificadas em condições normais. De fato, em doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Amiotrófica lateral, a disfunção e morte neuronal se dá em consequência ao acúmulo de agregados proteicos tóxicos e organelas danificadas, sendo que o aumento de autofagia parece representar uma intervenção terapêutica benéfica. O comprometimento na remoção de componentes celulares não benéficos pode afetar também a estrutura neuronal, visto que outros trabalhos apontam que neurônios com deleção de autofagia desenvolvem distrofia e degeneração de axônios no cerebelo de camundongos (Martinez-Vicente, 2015).

Além do envolvimento em doenças neurodegenerativas, destacamos também que a autofagia está intimamente envolvida na regulação hipotalâmica da ingestão alimentar. Recentemente, Oh e colaboradores (2016) demonstraram que a baixa disponibilidade de glicose resulta em indução de autofagia em resposta ao aumento de AMPK. Por sua vez, a autofagia foi capaz de atuar na ingestão alimentar ao controlar a expressão de *Npy* e *POMC*.

Em camundongos com deleção de *Atg7* especificamente em neurônios *POMC*, tanto a ingestão alimentar quanto o peso corporal foram aumentados (Quan *et al.*, 2012). Da mesma forma, camundongos com deleção de *Atg12* em neurônios *POMC* também apresentam aumento de ganho de peso e adiposidade associados ao aumento na ingestão alimentar durante o período experimental acompanhado (Malhotra *et al.*, 2015). Em contrapartida, a privação de nutrientes ativa a autofagia em neurônios *AgRP* especificamente na região do ARC (Kaushik *et al.*, 2011).

Na obesidade o declínio na atividade de autofagia parece acontecer em alguns tecidos e/ou tipos celulares. Evidências apontam que a autofagia hipotalâmica parece estar comprometida por mecanismos ainda não compreendidos. Por exemplo, nosso grupo de

pesquisa observou que a prole de mães com obesidade induzida por HFD apresentou alterações na modulação de marcadores de autofagia no hipotálamo após o desmame, bem como na vida adulta após a reexposição à HFD (Reginato et al., 2016). Também na vida adulta, a exposição crônica à HFD foi capaz de inibir o fluxo autofágico, sendo que o uso de rapamicina para a ativação desse mecanismo resultou em melhora de alguns parâmetros metabólicos de camundongos obesos (Meng & Cai, 2011; Portovedo et al., 2015).

Dados recentemente publicados, mostraram que o tratamento com palmitato em neurônios POMC foi capaz de diminuir a autofagia e isso foi associado à diminuição na sensibilidade à insulina nestes neurônios. Assim, sugere-se mais uma vez a importância deste mecanismo para o controle do balanço energético realizado pelo tecido hipotalâmico bem como um possível mecanismo alvo para o tratamento de quadros associados à resistência à insulina (Hernández-Cáceres et al., 2019).

Diante do exposto, fica claro que o entendimento dos mecanismos moleculares que relacionam a inflamação hipotalâmica ao comportamento alimentar é de grande interesse para o desenvolvimento de futuros alvos terapêuticos. Neste contexto, a importância da autofagia para a viabilidade neuronal bem como para a manutenção da homeostasia energética merece destaque. Assim, este trabalho avaliou o efeito de ácidos graxos na modulação de autofagia em três principais frentes: curta exposição à HFD de modo; tratamento intracerebroventricular com palmitato, e, por fim, uso de ácidos graxos para o tratamento direto em culturas de neurônios hipotalâmicos que expressam *Npy/AgRP*.

Como resultados, encontramos que a exposição aguda à HFD ou ao PA *in vivo* resultou em alterações na expressão gênica de marcadores de autofagia sem comprometer a sua atividade global no tecido hipotalâmico. A dieta HFD modulou genes diferentes do que o PA, sugerindo que a composição dietética e perfil de ácidos graxos interferem de modo específico na modulação de autofagia. Ao analisar especificamente neurônios *Npy/AgRP* encontramos que o tratamento com PA, mas não o palmitoleico (PO) ou mistura de ácidos graxos (NEFA) foi capaz de induzir a autofagia. O meio condicionado de células da micróglia tratadas com palmitato possui tendência a reduzir a autofagia neuronal, demonstrando que células não neuronais podem estar envolvidas nos efeitos crônicos da dieta HFD na modulação de autofagia hipotalâmica previamente publicados por nosso grupo. Por fim, identificamos que a inibição da síntese de *de novo* ceramidas, mas não a ativação do receptor TLR4, foi capaz de atenuar a indução de autofagia em resposta ao palmitato nas células de neurônios hipotalâmicos que expressam *Npy/AgRP*.

Portanto, neste trabalho observamos que tanto a dieta HFD quanto ácidos graxos saturados e insaturados isolados regulam a autofagia neuronal de modo distinto. E, que em relação aos efeitos específicos do palmitato, identificamos que a síntese de *de novo* ceramidas pode ser importante via a ser explorada para a modulação de autofagia. O entendimento dos mecanismos pelos quais os lipídios afetam a autofagia em neurônios que controlam o balanço energético é essencial para novos tratamentos que controlem o emergente crescimento da obesidade na população mundial.

2. OBJETIVOS:

2.1 Geral:

- Avaliar a modulação de autofagia hipotalâmica em resposta ao tratamento com ácido graxo saturado *in vitro* e *in vivo* e a relação com vias inflamatórias.

2.2 Específicos:

- Avaliar o efeito do uso ácido graxo saturado na modulação de autofagia bem como na ativação de vias inflamatórias e síntese de ceramidas em linhagem de célula hipotalâmica.
- Avaliar o papel do palmitato na modulação de autofagia hipotalâmica após tratamento i.c.v camundongos da linhagem *Swiss*.
- Avaliar os efeitos da curta exposição à dieta hiperlipídica na autofagia hipotalâmica em camundongos da linhagem *Swiss*.

3. MÉTODOS:

3.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas, protocolo CEUA: 3854-1. Os princípios Éticos para uso de Animais de Laboratório, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), foram rigorosamente seguidos, assim como a legislação nacional

vigente, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

3.2 Implante de cânulas no hipotálamo

Camundongos machos da linhagem *Swiss* mantidos em biotério, conforme descrito anteriormente (Portovedo et al., 2015), foram submetidos à canulação de ventrículo lateral por meio da cirurgia estereotáxica. Uma semana após o implante, foram utilizados em procedimentos experimentais com tratamento com ácido graxo saturado via intracerebroventricular (i.c.v). Para tanto, os camundongos anestesiados foram adequadamente posicionados no aparelho (Stoelning) para realização de cirurgia estereotáxica e, após tricotomia e anti-sepsia da região craniana, foi realizada incisão inter-parietal de aproximadamente 1,0 cm de extensão. Em seguida, o periósteo foi aberto e com a calota craniana exposta para individualizar o Bregma. A implantação das cânulas obedeceu coordenadas estereotáxicas previamente estabelecidas através do Atlas de Coordenadas Estereotáxicas (PAXINOS & WATSON). Depois de implantada, a cânula foi fixada ao crânio do animal com cimento acrílico polimerizante. Animais com resposta positiva à angiotensina II foram selecionados e utilizados nos experimentos. Para a infusão intracerebroventricular utilizamos uma seringa Hamilton (50 µL) acoplada, por meio de uma cânula plástica, a uma agulha 30 G, de modo que esta ultrapassasse o comprimento da cânula metálica (0,1 - 0,2 mm) garantindo a entrada do líquido no ventrículo lateral. Para verificar o efeito isolado do palmitato, os animais foram tratados i.c.v por 8 dias, sendo um tratamento diário de 2 µL com ácidos graxos a 180 µM (Milanski et al., 2009).

3.3 Curta exposição à dieta hiperlipídica

Para a investigação dos parâmetros metabólicos e modulação de autofagia nos animais que receberam dieta HFD por 1 ou 3 dias, foram utilizados camundongos *Swiss* machos recebidos com quatro semanas de vida. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais (Controle Adaptada e Hiperlipídica- 60% de lipídios). Para essa divisão, optou-se por controlar o peso dos animais de modo que todos os grupos experimentais apresentassem a mesma média de peso antes da introdução da dieta hiperlipídica, que ocorreu a partir da sexta semana de vida.

Tabela 1 – Composição das dietas (g)

Ingredientes	Controle	Hiperlipídica
Amido	410,7	20
Caseína	110	161
Farinha de trigo	200	240
Amido de Milho dextrinizado	115	39,1
Sacarose	25	100
Óleo de soja	40	40
Banha de porco	-	300
Celulose	50	50
Mistura de minerais	35	35
Mistura de vitaminas	10	10
L-cistina	1,8	2,4
Bitartrato de colina	2,5	2,5
Total	1000	1000

3.4 Dissecção do hipotálamo e Western Blot

Após confirmação da perda de reflexo, foi realizada a retirada do hipotálamo dos camundongos e em seguida, os tecidos foram congelados a -80°C . Posteriormente, as amostras de hipotálamo foram homogeneizadas em aproximadamente $400\ \mu\text{L}$ de tampão de solubilização contendo 1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10 mM de vanadato de sódio; 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C em *Polytron PTA 20S Generator* (Brinkmann Instruments mode PT 10/35) com velocidade máxima por 30 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 rpm a 4°C em um rotor “*Beckman 70,1*”, por 30 minutos para remoção de material insolúvel. A proteína total do sobrenadante foi determinada por meio do método colorimétrico de BCA espectrofotometria.

O sobrenadante foi utilizado para a preparação de extrato total. Para a avaliação da autofagia celular, determinou-se o conteúdo proteico das proteínas: LC3B-II (ab48394); p62 (ab56416, Abcam); pS6 (5364S, Cell Signaling); p-AMPK T172 (40H9, Cell signaling). Os controles endógenos selecionados foram: alfa tubulina (Sigma, T9026) e beta actina (Ab8227, Abcam). Para essa avaliação, os extratos proteicos ressuspensos em tampão de *Laemmli* foram fervidos ($5\ \text{min./}95^{\circ}\text{C}$). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação

por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com anticorpo específico. A ligação do anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado ou albumina; 10 mMol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 2 horas. O sinal foi detectado por meio de quimiluminescência utilizando kit da *Amersham* e seguindo as orientações do fabricante. As bandas identificadas na autoradiografia foram quantificadas através de densitometria óptica (*Uniscam*).

3.5 Real Time PCR das amostras de tecido hipotalâmico

Para a análise da expressão gênica, as amostras foram homogeneizadas em reagente Trizol e congeladas a -80°C . Posteriormente, foram transferidas para *ependorfs* com clorofórmio e centrifugadas para separação das fases. A fase superior aquosa foi transferida para novos *ependorfs*, sendo adicionado posteriormente o isopropanol. Após descanso de 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C , 10500 R.P.M, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 1 mL de etanol 75% e centrifugado por 10 minutos a 4°C , 8400 R.P.M. O sobrenadante foi novamente descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 100%, sendo o conteúdo centrifugado por mais 10 minutos, 4°C , 8.400 R.P.M. Após o descarte do etanol, 10 μL de água ultrapura foi adicionada e agitada até a dissolução total do pellet.

As amostras foram armazenadas a -80°C por 24h para que então a quantificação (Nanodrop) fosse realizada. A síntese de cDNA foi realizada com 3 μg do total de RNA usando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (AppliedBiosystems)*. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqManTM (*AppliedBiosystems*). Os valores da expressão gênica foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software (AppliedBiosystems)*. Os genes alvo foram corrigidos pela média do conteúdo de transcrito de *B-actina* e *GAPDH* e expressos em relação à expressão relativa ao grupo controle, assim o nosso controle foi considerado como 1 e os tratamentos corresponderam ao número de vezes (acima ou abaixo) em relação ao controle.

3.6 Condições de cultivo e tratamento das linhagens celulares

Para a avaliação da relação entre ativação de vias inflamatórias, síntese de ceramidas e autofagia hipotalâmica foram utilizadas as linhagens de neurônios hipotalâmicos imortalizadas mHypoA 2-29, mHypoE-46, mHypoA NPY/GFP e GT1-7. Todas elas expressam neurotransmissores *Npy* e *AgRP*, sendo que a linhagem GT1-7 é também utilizada em estudos com GnRH. As células da linhagem mHypoA 2-29 e GT1-7 foram mantidas em meio de cultura DMEM *high glucose* com 4,5 mg/L de glicose contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 uL/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. As linhagens mHypoA NPY/GFP e mHypoE-46 foram mantidas em meio *low glucose* contendo 2% de SFB, 100 u/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. Durante os tratamentos todas as células foram mantidas com os respectivos meios e com SFB na concentração de 2%. Utilizamos também células da linhagem microglial BV-2, mantidas em meio de cultura DMEM *high glucose* com 4,5 mg/L de glicose contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 uL/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina.

Os ácidos graxos: palmitato de sódio (P9767, Sigma), palmitoleico (P9417, Sigma) e mistura de ácidos graxos saturados e insaturados foram utilizados para os tratamentos em cultura celular. Uma solução de 50 mM foi preparada a cada experimento, diluindo-se em água e aquecendo-se a 60°C até a completa dissolução. A concentração final para cada experimento foi obtida com a pipetagem no meio de cultura. Os tempos de tratamento foram realizados conforme descrito na sessão *Resultados*.

3.7 Extração de proteínas e RTq-PCR das culturas das linhagens celulares

Após o tempo de tratamento desejado, as células foram lavadas com PBS 1x gelado. Foi adicionado o volume de 80-100 µL/poço de tampão de extração proteico (conforme descrito anteriormente) ou 800 µL/poço de reagente Trizol para extração de RNA. Para a leitura de proteínas utilizou-se o método BCA. Os demais procedimentos para a técnica *Western Blott* e RTq-PCR foram semelhantes ao empregado com o tecido hipotalâmico, descrito acima.

3.8 Citometria de fluxo das linhagens de neurônios hipotalâmicos, siRNA e imunofluorescência

Foi utilizado o kit comercial ab139484 a detecção da atividade de autofagia em cultura de células. Para as análises, as células foram plaqueadas em 85% de confluência por *well*.

Posteriormente foram tratadas com PA, PO, rapamicina, agentes inflamatórios e seus respectivos controles. Ao término do período experimental, foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura sem fenol. Após lavagens com Buffer 10X fornecido pelo kit, as células foram incubadas no escuro a 37°C por 30 minutos com o *Green Detection* e coletadas em citômetro BD Accuri C6 no canal FL1 (488 nm). Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizada a marcação com iodeto de propídeo (PI). Para tanto utilizou-se 20 ug/uL de PI, diluído em PBS. Após os tratamentos, foi adicionado 200 uL de tripsina/*well*. As células foram ressuspensas em 800 uL de meio (DMEN *High Glucose*), centrifugadas e impermeabilizadas com PI. As células foram levadas para a coleta no citômetro BD Accuri C6 no canal FL2 (585/40 nm) e FL3 (610/20nm).

Para a transfecção com o siRNA, as células foram plaqueadas na placa de 6 well. O protocolo de transfecção utilizando Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) foi seguido conforme descrito pelo fabricante. Utilizamos 25 pmol de siRNA por *well*. Para a imunofluorescência, as células foram fixadas em metanol, incubadas em anticorpos primários *overnight* em 4°C. Após o período, incubadas em solução BSA 1% com anticorpo secundário por 2 horas e montadas em Vectashield.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram apresentados em média e erro padrão da média. Para a comparação de médias entre dois grupos, foi aplicado o teste *T Student* para amostras independentes. Quando necessário, para as comparações de diferentes concentrações ou doses de tratamento em relação ao controle foi utilizado análise de variância (ANOVA) com pós-teste *Dunnet* ou *Tukey*, conforme descrito na legenda das figuras. Em todos os casos o nível de significância para rejeição da hipótese nula foi de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando o programa *Statistic for Windows*, versão 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

4. RESULTADOS:

4.1 O tratamento agudo com lipídeos não altera a atividade global de autofagia no tecido hipotalâmico de camundongos da linhagem Swiss:

Para investigar o efeito agudo de lipídios na autofagia no tecido hipotalâmico, inicialmente alimentamos camundongos machos da linhagem *Swiss* por 1 ou 3 dias de dieta

HFD. A exposição à HFD foi capaz de aumentar significativamente o peso dos animais a partir do segundo dia de exposição mantendo-se maior até o terceiro dia de ingestão da dieta (Figura 04 A), semelhante ao encontrado em trabalhos já descritos em literatura (Thaler et al., 2012; Portovedo et al, em fase de submissão). O aumento na massa corporal foi acompanhado por aumento na glicemia de jejum após 3 dias do uso da dieta HFD (Figura 04 C). Conforme esperado, a ingestão calórica foi maior no grupo HFD comparado ao grupo controle, após 1 ou 3 dias de ingestão (Figura 4 D-E). Por fim, o tecido adiposo epididimal foi maior nos animais expostos agudamente à HFD (Figura 04 F). Em conjunto, os dados demonstraram que a curta exposição à dieta HFD resultou na alteração de parâmetros metabólicos do modelo experimental estudado.

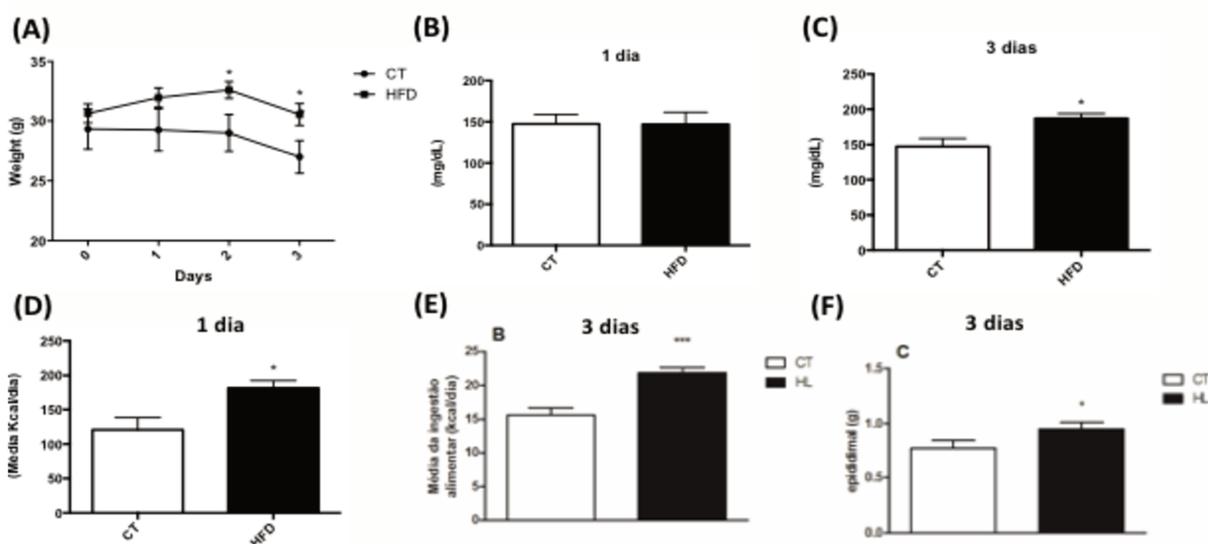


Figura 04. Parâmetros metabólicos após curta exposição à HFD. (A) Curva de ganho de peso (g). (B) e (C) Glicemia de jejum (1 e 3 dias) (mg/dL). (D) e (E) Ingestão alimentar com 1 e 3 dias (kcal/dia). (F) Peso do tecido epididimal (g). Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. N=5 animais/grupo. *Unpaired Teste T*.

Frente ao comprometimento do perfil metabólico do animal exposto à dieta HFD, seguimos para a investigação do impacto agudo da dieta HFD na modulação de autofagia hipotalâmica. Como resultados, encontramos que os animais alimentados com dieta HFD apresentam aumento na expressão gênica de *Npy*, *AgRP*, *TNF α* após 1 ou 3 dias (Figura 05 A e C). Encontramos aumento na expressão gênica de BCN e SQSTM, marcadores da modulação de autofagia (Figura 05 B e D). Em relação ao conteúdo proteico dos principais marcadores da maquinaria autofágica, não encontramos diferenças estatísticas em resposta ao uso de HFD (Figura 05 E-F). Interessante, a autofagia no tecido hepático após esse mesmo protocolo de

curta exposição já foi capaz de alterar o conteúdo proteico dos marcadores de autofagia (dados não mostrados).

Frente a isso, acreditamos que a curta exposição à dieta HFD é capaz de perturbar a homeostasia do tecido hipotalâmico, incluindo a indução de genes relacionados a atividade de autofagia. No entanto, o processo permanece preservado, talvez na tentativa de combater os efeitos deletérios do excesso de lipídios ao tecido.

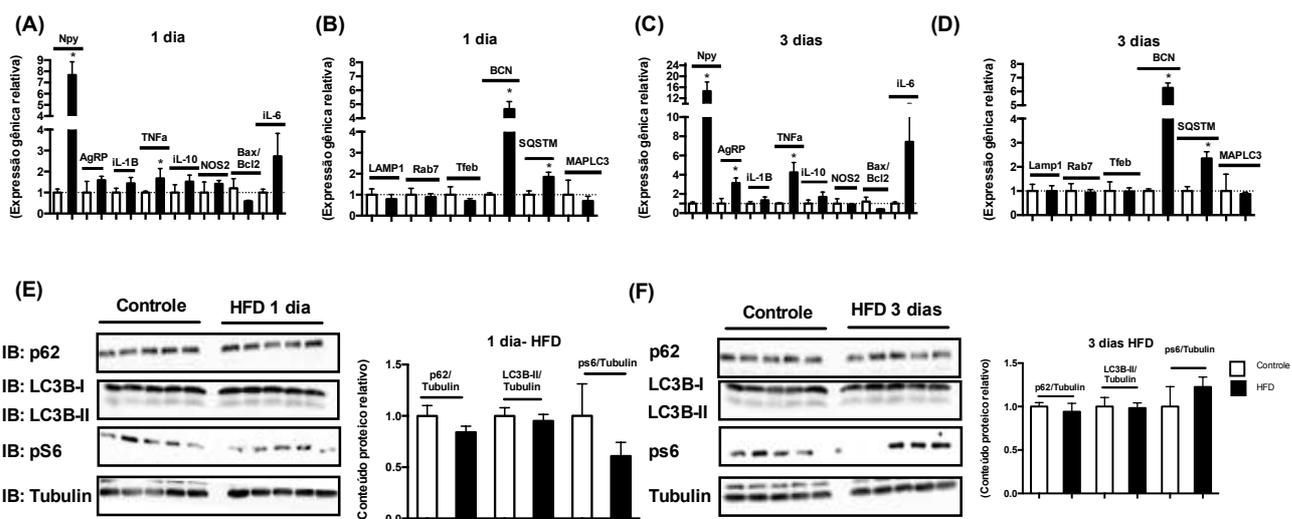


Figura 05. Modulação de autofagia hipotalâmica após curta exposição à HFD. (A-D) Expressão gênica relativa de marcadores de inflamação, estresse e autofagia com 1 e 3 dias. (E-F) Conteúdo proteico de marcadores de autofagia. Os valores representam a média \pm EPM, $*p \leq 0,05$. N=5 animais/grupo. *Unpaired Teste T*.

4.2 O papel do palmitato na autofagia hipotalâmica após tratamento intracerebroventricular (i.c.v.):

Em indivíduos obesos o nível de ácidos graxos circula na concentração de aproximadamente 400 μ M a 5 mM, com destaque para os níveis de palmitato que representa cerca de 40% dessa taxa (Liu et al., 2015; Chan et al., 2017). Assim, em razão de ser o ácido graxo saturado mais abundante na circulação e um dos principais componentes das dietas hiperlipídicas, o palmitato é frequentemente utilizado como representante da gordura saturada em experimentos em modelos de camundongos ou cultura de células (Hodson et al., 2009). Assim, o nosso próximo passo foi avaliar se o efeito isolado de um ácido graxo de cadeia saturada poderia alterar a modulação de autofagia no tecido hipotalâmico via tratamento i.c.v.

O tratamento com o palmitato i.c.v durante o período de 08 dias foi capaz de reduzir o peso dos animais associado a menor ingestão alimentar (Figura 06 A e B), conforme publicado previamente por nosso grupo de pesquisa (Milanski et al., 2009). Encontramos uma tendência à diminuição na expressão de *Npy*, novamente demonstrando o papel de lipídeos como moduladores do controle da ingestão alimentar exercido pelo hipotálamo (Figura 06 E). O palmitato foi capaz de induzir a expressão gênica de *Lamp1* e *Rab7*, diminuindo a expressão de MAPLC3 (gene para a proteína LC3) (Figura 06 E).

Para confirmar se a atividade de autofagia estaria de fato comprometida, avaliamos novamente o conteúdo proteico dos principais marcadores. Encontramos redução no conteúdo da proteína pS6, alvo *downstream* do complexo 1 de mTORC (mTORC1), importante regulador negativo do processo de autofagia. Porém, não encontramos diferença significativa no conteúdo de p62 e LC3B-II (Figura 06 F). Com isso, acreditamos que, assim como a dieta HFD, o palmitato interfere na expressão de genes relacionados à ativação do processo autofágico.

Assim, esse grupo de resultados demonstraram que os lipídios são capazes de comprometer a homeostasia neuronal, incluindo a expressão de *Npy/AgRP*, e, isso ocorre em associação a mudanças na expressão gênica de marcadores de autofagia.

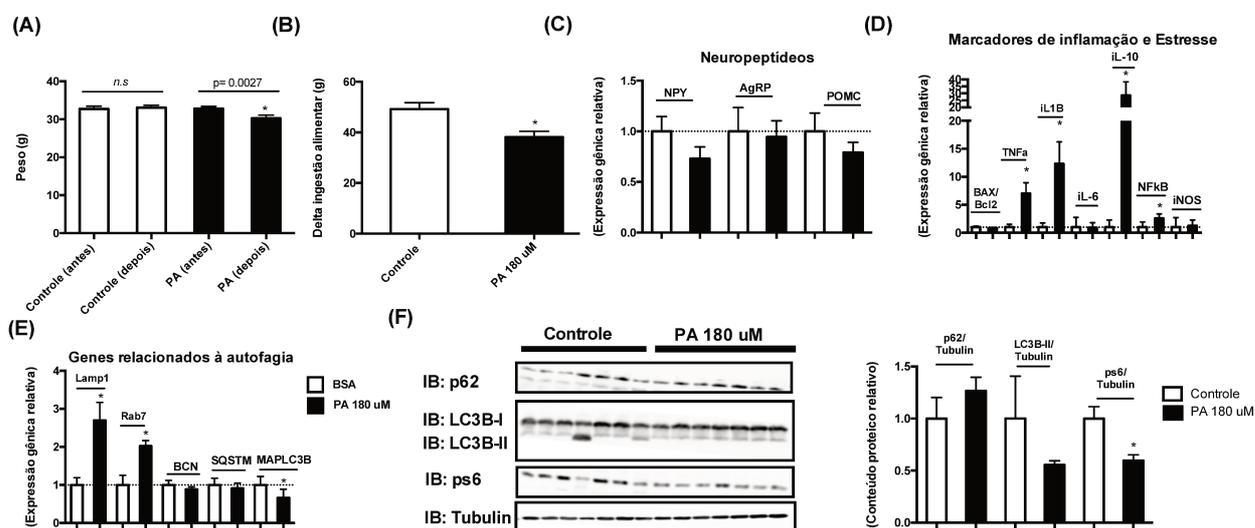


Figura 06. Modulação de autofagia em resposta ao tratamento com palmitato intracerebroventricular (180 uM). (A) Ganho de peso (g) inicial e final do grupo controle e i.c.v (B) Delta da ingestão alimentar (g/dia) (C), (D) e (E) Expressão gênica relativa de marcadores de inflamação, estresse e autofagia, respectivamente após tratamento i.c.v. (F) Conteúdo proteico de marcadores de autofagia. Os valores representam a média \pm EPM, * $p < 0,05$. N=5-10 animais/grupo. *Unpaired Teste T*.

4.3 O papel da autofagia na homeostasia de neurônios hipotalâmicos:

O nosso próximo passo foi a investigação *in vitro* do papel de ácidos graxos na autofagia neuronal. Inicialmente, avaliamos a importância do processo de autofagia para a expressão de *Npy*. Para isso, utilizamos linhagens de neurônios hipotalâmicos que co-expressam *Npy/AgRP*, conhecidas como mHypoE-46. Foi realizado o procedimento de transfecção com o siRNA para o gene *Atg7*, comumente utilizado para a inibição de autofagia. Como resultados, encontramos que a diminuição de autofagia altera a expressão gênica de *Npy* e *iL-6* o que pode possivelmente comprometer a homeostasia neuronal (Figura 07 A-G). Esses dados confirmam, portanto, a importância da autofagia em neurônios hipotalâmicos.

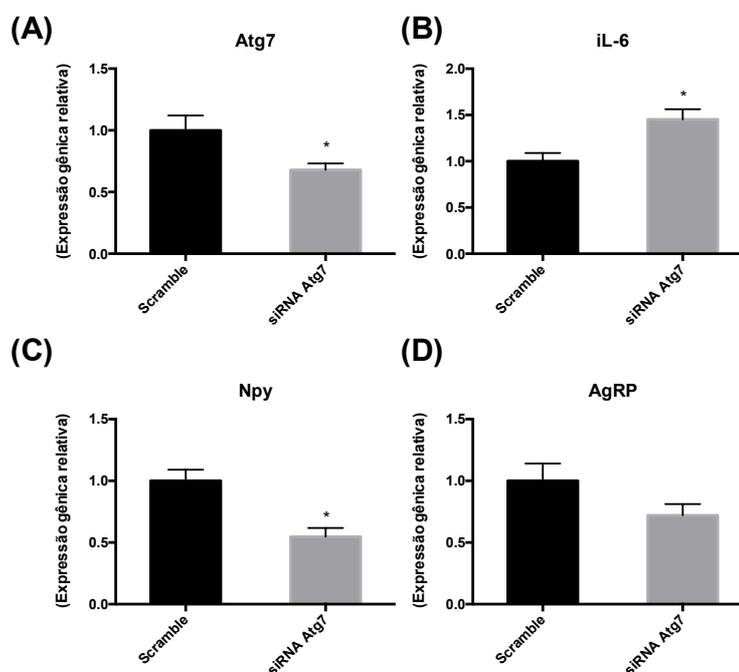


Figura 07. O papel da autofagia em linhagem de neurônios hipotalâmicos. (A-D) Expressão gênica relativa nas células de neurônios hipotalâmicos mHypoE-46. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. N=3-4 wells/grupo. *Unpaired Teste T*.

Em síntese, este primeiro grupo de resultados demonstraram que os lipídios parecem atuar na expressão de *Npy/AgRP in vivo* sendo que a autofagia por sua vez é capaz de modular a expressão gênica de *Npy* em linhagens de neurônios hipotalâmicos *in vitro*.

4.4 O palmitato altera a viabilidade celular em linhagens de neurônios hipotalâmicos:

Para prosseguir com a avaliação da relação entre lipídios e autofagia selecionamos algumas linhagens que co-expressam *Npy/AgRP*, conforme mencionado acima. A primeira delas foi a linhagem neuronal GT1-7. Essa linhagem desenvolvida por Mellon e colaboradores (1990), foi gerada a partir de tumores em neurônios de camundongos transgênicos expressando o antígeno híbrido GnRH-SV40T. As células GT1-7, portanto, apresentam marcadores específicos neuronais com uma eficiente maquinaria secretória previamente testada (Mellon et al., 1990). Optamos por acompanhar os efeitos de tratamento com palmitato nas concentrações 50 e 250 μM de durante os tempos de 04 horas, 24 horas e 36 horas, períodos estes já utilizados em outros estudos em cultura celular de neurônios (Ye et al., 2016).

Inicialmente, para avaliar os efeitos do tratamento com palmitato na viabilidade das células GT1-7, fizemos a marcação com o iodeto de propídeo por citometria de fluxo. O iodeto de propídeo é uma molécula que se intercala em qualquer DNA desde que a membrana celular esteja danificada de modo a ser permeável. A Figura 08 C mostra que após 36 horas a concentração de 250 μM de palmitato foi capaz de diminuir a viabilidade das células GT1-7, acompanhada por alterações no tamanho dessas células (Figura 08 D e H). Não encontramos alterações na concentração de 50 μM . Avaliamos a exposição do palmitato em uma concentração superior (500 μM), e com isso encontramos que a viabilidade e morfologia celular alteraram-se drasticamente (dados não mostrados).

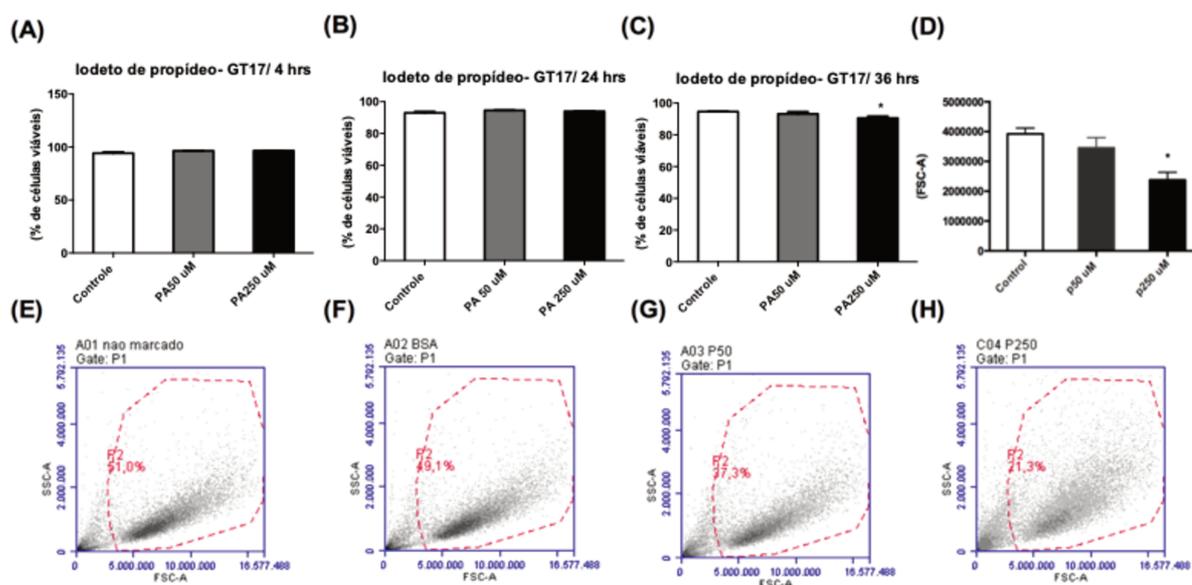


Figura 08. Viabilidade celular na linhagem GT1-7. Marcação com Iodeto de Propídeo (PI) (20 µg/mL) em citometria de fluxo. **(A-C)** % de células viáveis comparadas ao controle. **(D)** FSC-A após a marcação com PI. **(E-F)** Gráfico ilustrativo de SSC-A vs FSC-A após 36 horas de tratamento com palmitato (50 ou 250 µM). n= 1- 2 experimentos independentes, em triplicata para cada período analisado. Os valores representam a média ± EPM, *p<0,05. *Anova One Way* com teste *Dunnet*.

Para investigar as funções hipotalâmicas relacionadas à homeostasia energética fez-se necessário o uso de linhagens celulares que representassem da melhor maneira possível as funções hipotalâmicas *in vivo*. Dessa forma, selecionamos também outras linhagens: mHypoE-46 (clonal; embrionária; derivada de camundongos machos) e mHypoA 2-29 (clonal; adulta; derivada de camundongos machos) visto que linhagem GT1-7 expressa *AgRP* apenas em consequência do processo de imortalização. Ao contrário, as demais linhagens citadas foram geradas de modo a preservar a expressão endógena de *Npy/AgRP*. Para corroborar os efeitos observados, foi utilizada também a linhagem mHypoA NPY/GFP (não clonal; adulta; derivada de camundongos fêmeas). As linhagens “*mHypo*” foram cedidas pelo laboratório da professora Dra. Denise Belsham da Universidade de Toronto, Canadá (Belsham et al., 2004; Belsham et al., 2009).

Na linhagem embrionária mHypoE-46 o período de 24 horas a concentração de 50 µM reduziu a viabilidade bem como alterou a morfologia celular, sugerindo que essas células poderiam estar sendo direcionadas para o processo de apoptose celular (Figura 09 A-D). Concentrações maiores de palmitato foram fatais à célula, descolando-se todas da placa. Na

linhagem adulta mHypoA 2/29, o palmitato reduziu a viabilidade celular nas concentrações de 250 μ M após 24 e 36 horas, seguido por alterações na morfologia celular (Figura 10 A- C).

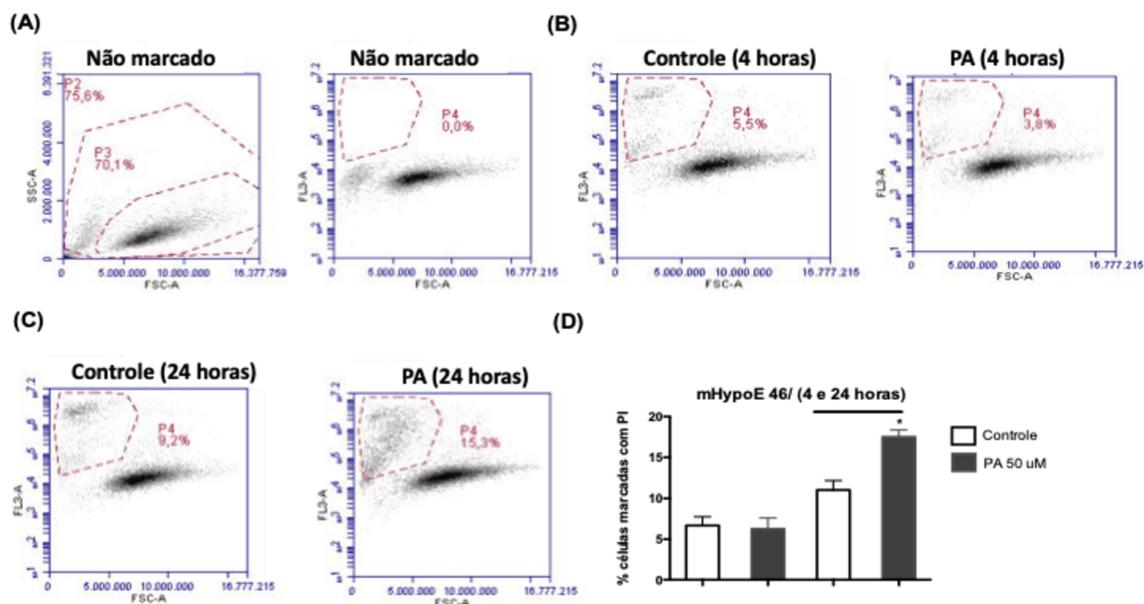


Figura 09. Viabilidade celular na linhagem mHypoE-46. Marcação com Iodeto de Propídeo (PI) (20 μ g/mL) em citometria de fluxo. (A, B, C) Gráfico ilustrativo FSC-A vs FL3 após a marcação com PI. (D) % de células marcadas com PI. n= 3 experimentos independentes, em triplicata para cada período analisado. Os valores representam a média \pm EPM, *p \leq 0,05. *Unpaired Teste T*.

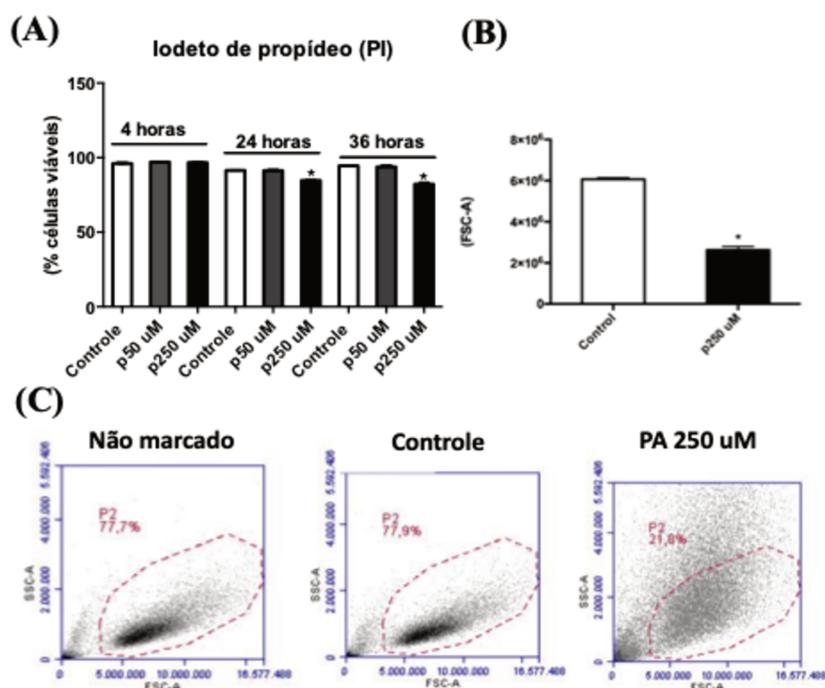


Figura 10. Viabilidade celular na linhagem mHypoA 2/29. Marcação com Iodeto de Propídeo (PI) (20 µg/mL) em citometria de fluxo. **(A)** % de células viáveis após tratamento com palmitato. **(B)** Gráfico ilustrativo FSC após a marcação com PI no tratamento 24 horas. **(C)** Gráfico ilustrativo FSC vs FL3. n= 2-3 experimentos independentes, em triplicata para cada período analisado. Os valores representam a média ± EPM, *p≤0,05. *Unpaired Teste T*.

Para melhor elucidar o papel do palmitato na modulação de autofagia neuronal, optamos por prosseguir utilizando ambas as concentrações investigadas (50 e 250 µM- proporcionando ou não declínio na viabilidade celular). No entanto, houve a exceção para a linhagem mHypoE-46 que apresentou precocemente declínio na viabilidade celular na concentração de 250 µM, conforme descrito acima.

4.5 O perfil de expressão gênica em resposta ao tratamento com palmitato em linhagens de neurônios hipotalâmicos:

Estudos recentes ao avaliarem os efeitos do palmitato na homeostasia de neurônios hipotalâmicos reportaram indução na expressão de neuropeptídeos *Npy* e *AgRP* bem como alguns marcadores inflamatórios e de estresse de retículo endoplasmático (ERE), como *Tnfa* e *iL-6*; *Bax/Bcl2* e *Chop* (Ye et al., 2016; Dalvi et al., 2017; Tse et al., 2018). Para confirmar a eficácia do tratamento com palmitato em nosso modelo, também avaliamos a expressão gênica após 4 e 24 horas nas linhagens celulares. Depois de 4 horas de tratamento, houve aumento na

expressão gênica de *iL-6* (Figura 11 A) na linhagem mHypoE-46. Após 24 horas, encontramos aumento na expressão de *Npy* e na razão *Bax/Bcl2* na linhagem mHypoE-46, confirmando o potencial pró-apoptótico do palmitato em neurônios bem como no controle do comportamento alimentar (Figura 11 C). Há uma tendência ao aumento na expressão de *AgRP* após 4 horas ($p=0.1325$) e 24 horas ($p=0.1968$) nessa linhagem (Figura 11).

Da mesma forma, na linhagem mHypoA 2/29 encontramos aumento na expressão de *iL-6*, *Nos2*, *Bax/Bcl2* e *TNFa* em resposta ao tratamento com palmitato (Figura 12 A-B). Não observamos amplificação para o gene *Npy* na linhagem celular mHypoA 2-29. Segundo o laboratório responsável pela imortalização dessa linhagem, a análise de *Npy* em linhagens de camundongos adultos geralmente é de difícil detecção utilizando o ensaio *Taqman* disponível em nosso laboratório. No entanto, há uma tendência ao aumento em *AgRP* na concentração de 50 μM por 4 horas ($p=0.3018$) e aumento significativo após 24 horas (Figura 04- A e B).

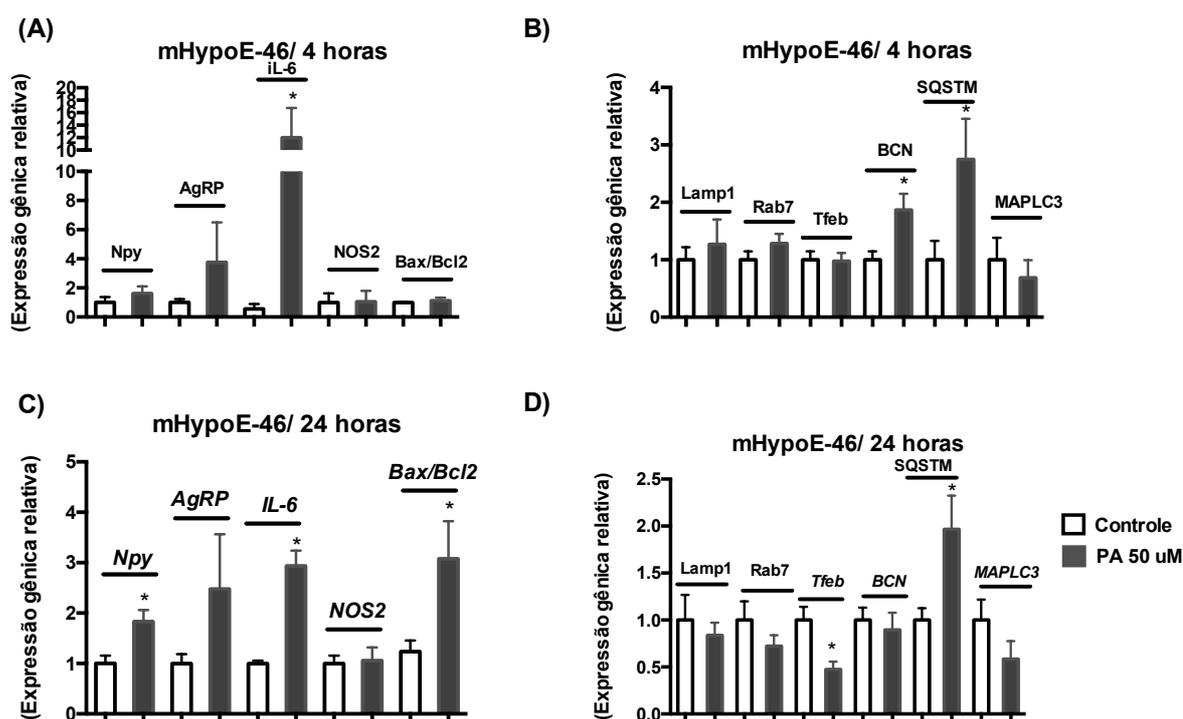


Figura 11. Avaliação da expressão gênica após o tratamento com palmitato na linhagem mHypoE-46. O tratamento com palmitato foi realizado no tempo e concentração indicados. (A) e (B) Expressão gênica relativa de marcadores de neuropeptídeos, inflamação, estresse e autofagia, após 4 horas de tratamento com palmitato, respectivamente. (C) e (D) n=3 experimentos independentes, em 3-5 poços para cada período analisado. Os valores representam a média \pm EPM, $*p \leq 0,05$. *Teste T Student*.

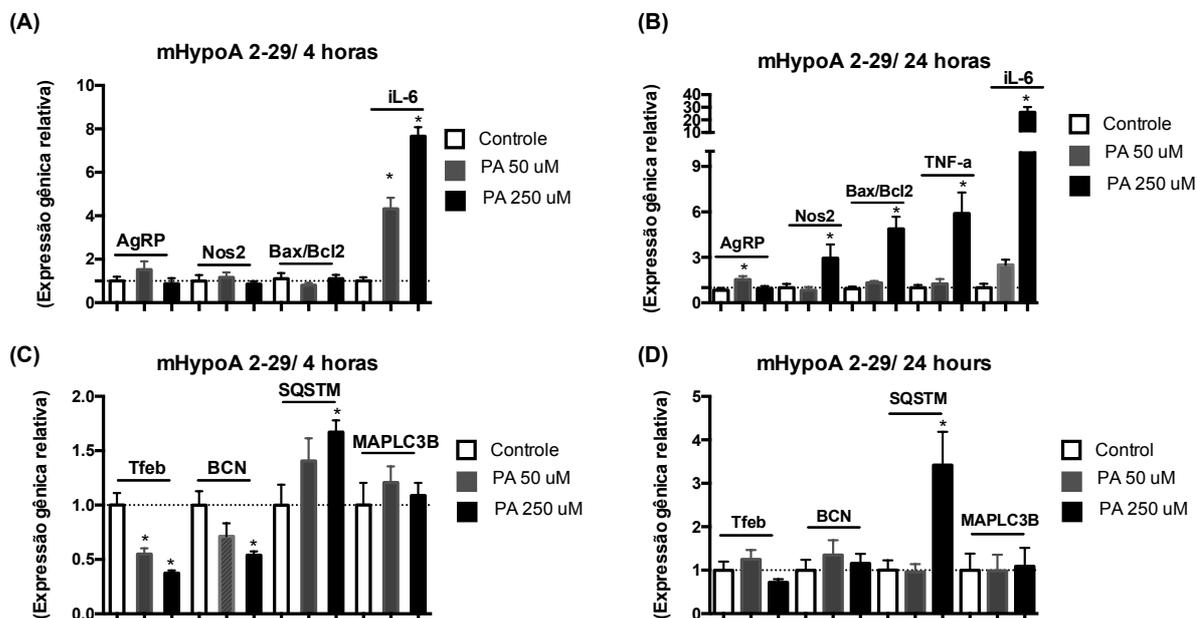


Figura 12. Avaliação da expressão gênica após o tratamento com palmitato na linhagem mHypoA-2/29. O tratamento com palmitato foi realizado no tempo e concentração indicados. (A) e (D) Expressão gênica relativa de marcadores de neuropeptídeos, inflamação, estresse e autofagia, após 4 horas de tratamento com palmitato, respectivamente. (B) e (E) n=2 experimentos independentes, em 3-5 poços para cada período analisado. Os valores representam a média \pm EPM, * $p < 0,05$. Anova One Way com teste Dunnet.

Na continuidade dos experimentos, avaliamos a habilidade do palmitato em alterar a expressão de marcadores de autofagia. O tratamento por 4 ou 24 horas resultou em perfil de expressão diferente entre as linhagens analisadas. Por exemplo, houve diminuição nos níveis de *Tfeb* e *BCN* (gene para a proteína Beclin) na linhagem mHypoA 2-29 acompanhado por aumento de *BCN* na linhagem mHypoE-46, após 4 horas de tratamento (Figura 11 B e Figura 11 D). Embora ambas as linhagens sejam provenientes de camundongos machos, acreditamos que a diferença entre a passagem das células no momento da extração e a metodologia de imortalização, como o uso de CTNF (*ciliary neurotrophic factor*) na imortalização de células adultas possa refletir em diferenças em alguns parâmetros analisados. A expressão do gene da proteína p62 (SQSTM) esteve aumentado em ambas as linhagens (Figuras 11 B e D; Figura 12 D e E).

Em conjunto, esses resultados demonstraram que o tratamento com palmitato perturbou a regulação da maquinaria autofágica. Sabendo que a autofagia é um processo altamente dependente de alterações pós-transcricionais e que a cultura de células possibilita o uso de

técnicas adicionais para a confirmação do processo, prosseguimos para a avaliação da atividade de autofagia por outros métodos.

4.6 Conteúdo proteico de marcadores de autofagia em linhagens de neurônios hipotalâmicos:

Segundo Mizushima e colaboradores (2010): “*Avaliar a autofagia, um importante processo dinâmico, utilizando medidas estáticas, é um desafio para os cientistas da área*”. Assim, optamos por combinar o uso de *Western Blott* e da técnica de Citometria de Fluxo para avaliar a autofagia em neurônios hipotalâmicos.

O tratamento com palmitato durante 4 e 24 horas resultou em diminuição nos níveis da proteína p-S6 (Figura 13 A- D) na linhagem mHypoA 2-29. Na linhagem mHypoE-46 encontramos diminuição após o tratamento com 24 horas (Figura 14 A- D). A proteína pS6 é um alvo “*dowstream*” da via da mTORC1. Estudos prévios já publicaram que o uso de rapamicina ou a privação de nutrientes para inibição do complexo mTORC1 é capaz de induzir a autofagia em células pela desfosforilação do complexo ULK1, ULK2 e Atg13 (Jung *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2009). Desse modo, a diminuição no conteúdo proteico de p-S6 indica um estímulo para a indução de autofagia.

Não houve nenhuma diferença significativa no conteúdo proteico de p62 após 4 horas do estímulo com palmitato em ambas as linhagens. No entanto, houve aumento significativo após 24 horas (Figura 13 B e D) na linhagem mHypoA 2-29 bem como aumento na linhagem mHypoE-46 (Figura 14 C e D). Os níveis de p62 geralmente são inversamente correlacionados com a atividade de autofagia. No entanto, essa proteína também está relacionada a outras vias celulares como por exemplo, a participação na entrega de proteínas como a *Tau* para a degradação pelo proteassoma (Liu *et al.*, 2016). Em adição, o aumento na expressão de p62 está relacionado ao efeito protetor em algumas linhagens celulares de modo a contribuir para a sobrevivência (Bjorkoy *et al.*, 2005). Acreditamos que o papel da p62 em células neuronais ainda deve ser esclarecido.

Avaliamos o conteúdo da proteína LC3B-II, um dos principais marcadores da modulação de autofagia devido a sua presença na membrana do autofagossomo. O conteúdo proteico deste marcador em ambas as linhagens foi maior em comparação ao grupo controle (Figuras 13 e 14). Em conjunto, os marcadores analisados sugerem que o palmitato pode ser capaz de induzir a autofagia em ambas as linhagens nos tempos e concentrações indicados nas figuras. Para confirmar este achado, utilizamos também a linhagem proveniente de

camundongos fêmeas mHypoA NPY/GFP. Os resultados contidos na Figura 15 sugerem que linhagens derivadas de camundongos machos e fêmeas parece não diferir em resposta ao dados na modulação de autofagia.

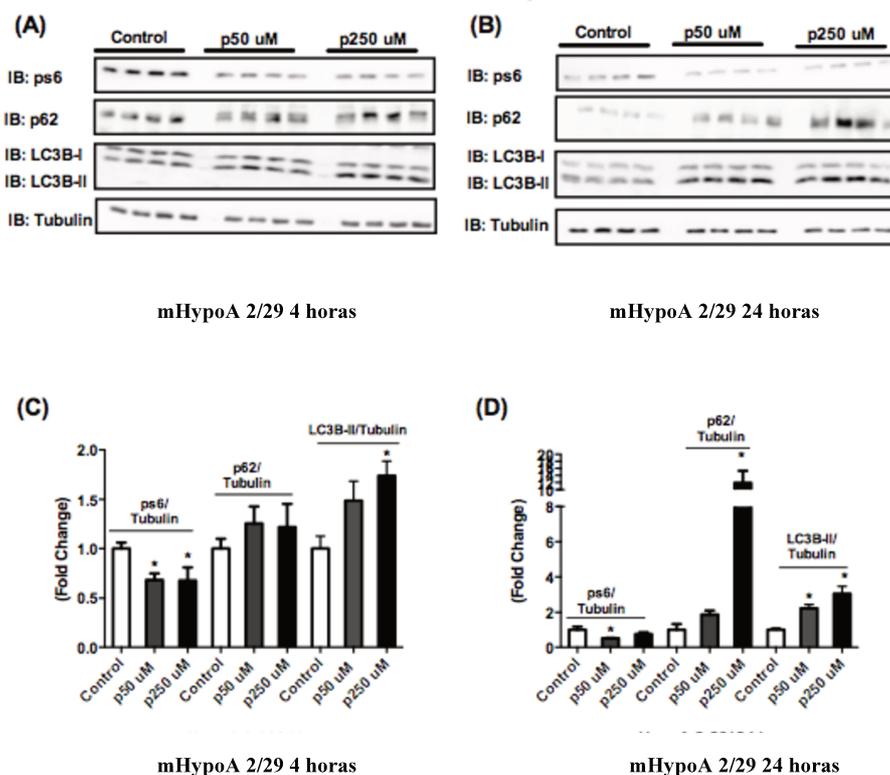


Figura 13. Avaliação do conteúdo proteico de marcadores de autofagia na linhagem mHypoA- 2-29. O tratamento com palmitato foi realizado no tempo e concentração indicados. **(A, B)** *Imunoblotting* representativo das proteínas pS6, p62 e LC3B-II. **(C, D)** Gráfico representativo do conteúdo proteico corrigido pelo controle endógeno (alfa tubulina). n=1 experimento independente em 4 poços para cada período analisado. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. *Anova One Way* com teste Dunnet.

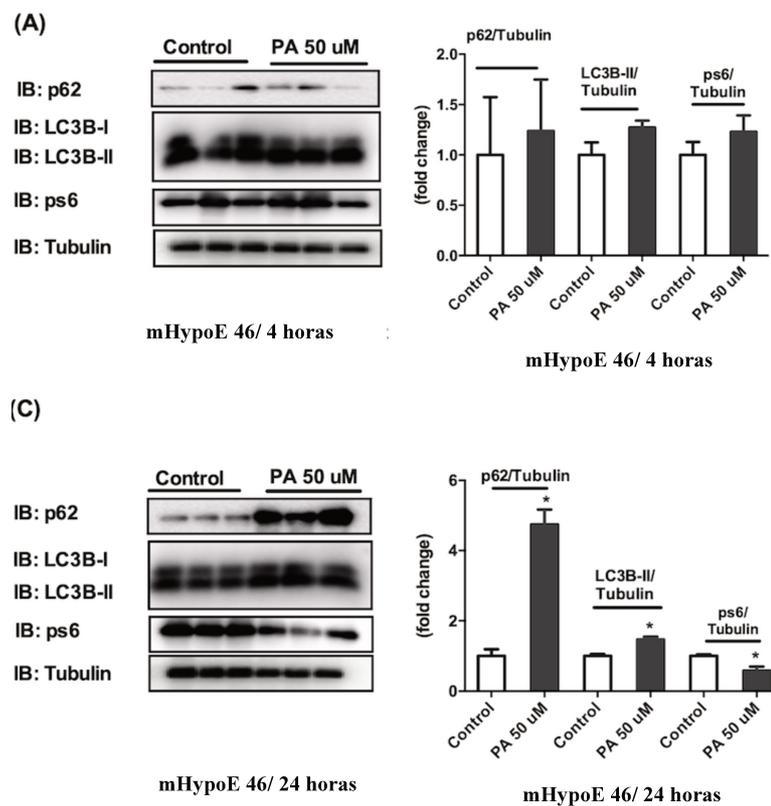


Figura 14. Avaliação do conteúdo proteico de marcadores de autofagia na linhagem mHypoE-46. O tratamento com palmitato foi realizado no tempo e concentração indicados. (A, B) *Imunoblotting* representativo das proteínas pS6, p62 e LC3B-II. (C, D) Gráfico representativo do conteúdo proteico corrigido pelo controle endógeno (alfa-tubulina). n= 3 experimentos independentes. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. Teste *T Student*

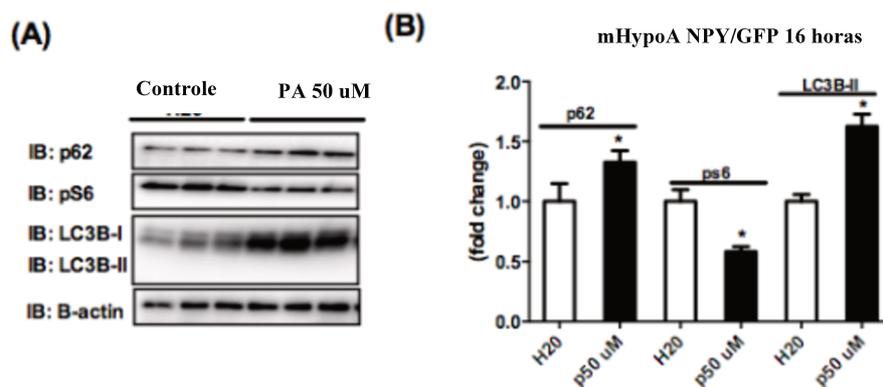


Figura 15. Avaliação do conteúdo proteico de marcadores de autofagia na linhagem mHypoA NPY/GFP. O tratamento com palmitato foi feito por 16 horas. (A) *Imunoblotting* representativo das proteínas pS6, p62 e LC3B-II. (B) Gráfico representativo do conteúdo proteico corrigido pelo controle endógeno (b-actina). n= 3 experimentos independentes em 3 poços para cada período analisado. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. Teste *T Student*

O inibidor vacuolar de ATPase, conhecido como Bafilomicina A1, é uma das drogas mais comumente utilizadas para avaliar o fluxo de autofagia em células, sendo que a dose utilizada deve ser em baixa concentração por um período curto (<4 h). O uso dessa droga resulta na inibição da fusão entre autofagossomo e lisossomo (Mizushima et al., 2010). A Figura 16 A-E mostra a imagem representativa do uso dessa droga nas linhagens neuronais. Em todas as linhagens testadas, a inibição da fusão parece ser responsável por aumentar o conteúdo de LC3B-II o que indica possivelmente uma indução no fluxo de autofagia. Assim, o tratamento com palmitato parece aumentar o conteúdo LC3B-II em uma intensidade superior na condição palmitato combinado com bafilomicina (4 hoas), o que confirma a indução na autofagia nas linhagens investigadas.

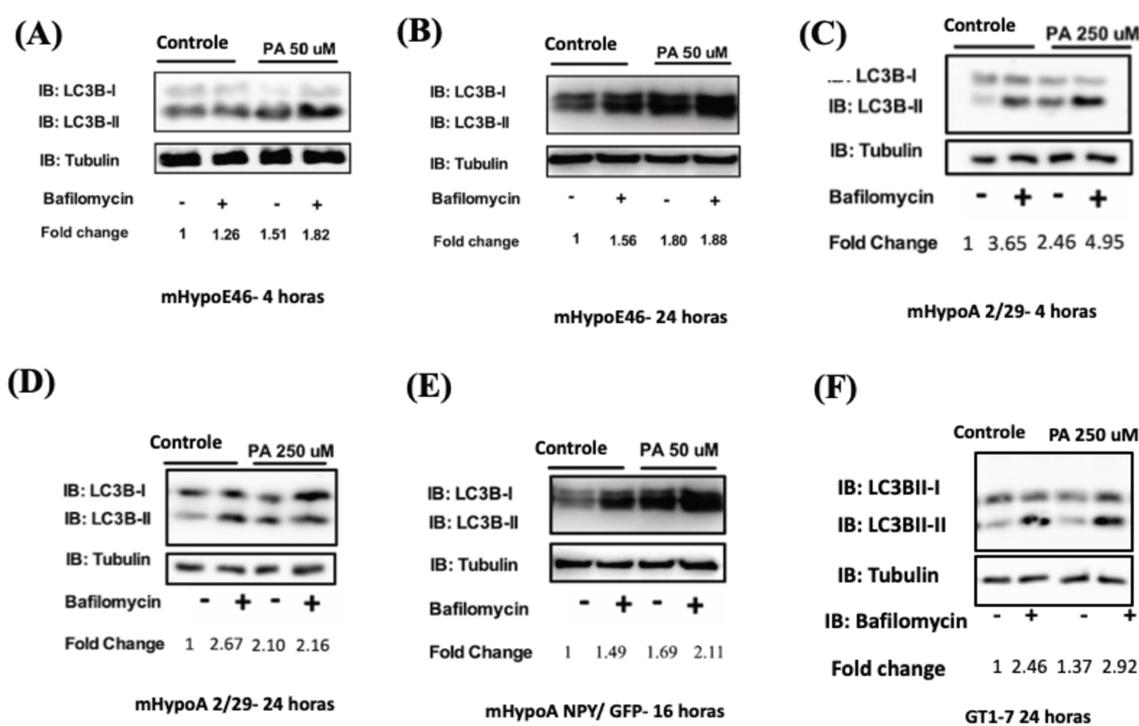


Figura 16. Uso de bafilomicina A1 (4 horas) para investigação do fluxo de autofagia em linhagem de neurônios hipotalâmicos. (A- F) *Imunoblotting* representativo de LC3B-I e II e tubulina estimulados ou não com bafilomicina A1 (100 nM) nas diferentes linhagens neuronais. n=1-2 para cada linhagem.

4.7 Modulação de autofagia detectada por citometria de fluxo em linhagens de neurônios hipotalâmicos:

Utilizamos como técnica adicional para a detecção de autofagia a marcação de vacúolos autofágicos por meio do uso do kit ab139484. O sinal detectado no canal FL1-1 foi quantificado

para a comparação entre os tratamentos. O uso da citometria de fluxo possibilita a avaliação da autofagia especificamente em células viáveis, já que é possível a exclusão de *debris* e células marcadas com PI. Assim, com essa técnica acreditamos que seja possível uma avaliação ainda mais precisa quando comparado ao Western Blot.

Inicialmente testamos a eficácia da técnica avaliando a indução da autofagia em resposta à retirada de soro fetal bovino (FBS) do meio de cultura bem como o tratamento com rapamicina, ambos pelo período de 04 horas. A rapamicina foi capaz de aumentar o conteúdo de LC3B-II acompanhado da diminuição no conteúdo da proteína S6 (Figura 17 A). Assim, prosseguimos para confirmação da capacidade do kit de autofagia em marcar as vesículas autofágicas. Os dados contidos na figura 17 ilustram que ambos os controles positivos empregados neste estudo foram capazes de aumentar a marcação de fluorescência detectada pelo aparelho do citometro nas linhagens GT1-7 (Figura 17 B) bem como na linhagem mHypoE-46 (Figura 17 C-E).

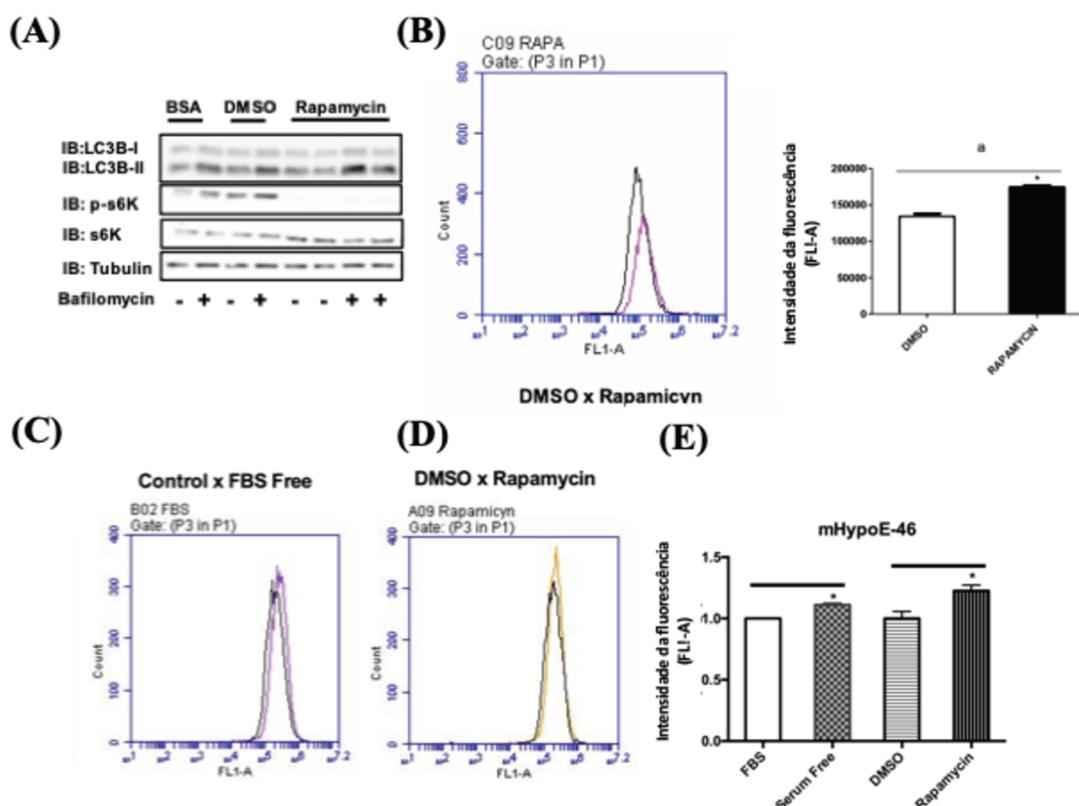


Figura 17. Padronização da modulação de autofagia em linhagem de neurônios hipotalâmicos. (A) *Imunoblotting* representativo de LC3B-I e II; p-s6; s6 total e tubulina estimulados ou não com bafilomicina A1 (100 nM). (B) Valores absolutos da intensidade de marcação em FL1-A (DMSO *versus* Rapamicina) nas linhagens GT1-7 e mHypoE-46, respectivamente. N=1-3 experimentos independentes. Média \pm EPM, * $p \leq 0,05$.

Prosseguimos para a avaliação da modulação de autofagia em resposta ao tratamento com palmitato nas diferentes linhagens que expressam *Npy/AgRP*. As figuras 18, 19 e 20 ilustram que o palmitato é capaz induzir a autofagia nos tratamentos durante 4, 24 e 36 horas. Apenas na linhagem mHypoA 2/29 após 36 horas o número de células foi insuficiente para a marcação, resultando em menor fluorescência detectada. No entanto, isso não reflete diminuição na atividade de autofagia, apenas se refere ao número inadequado de células viáveis para a detecção no kit.

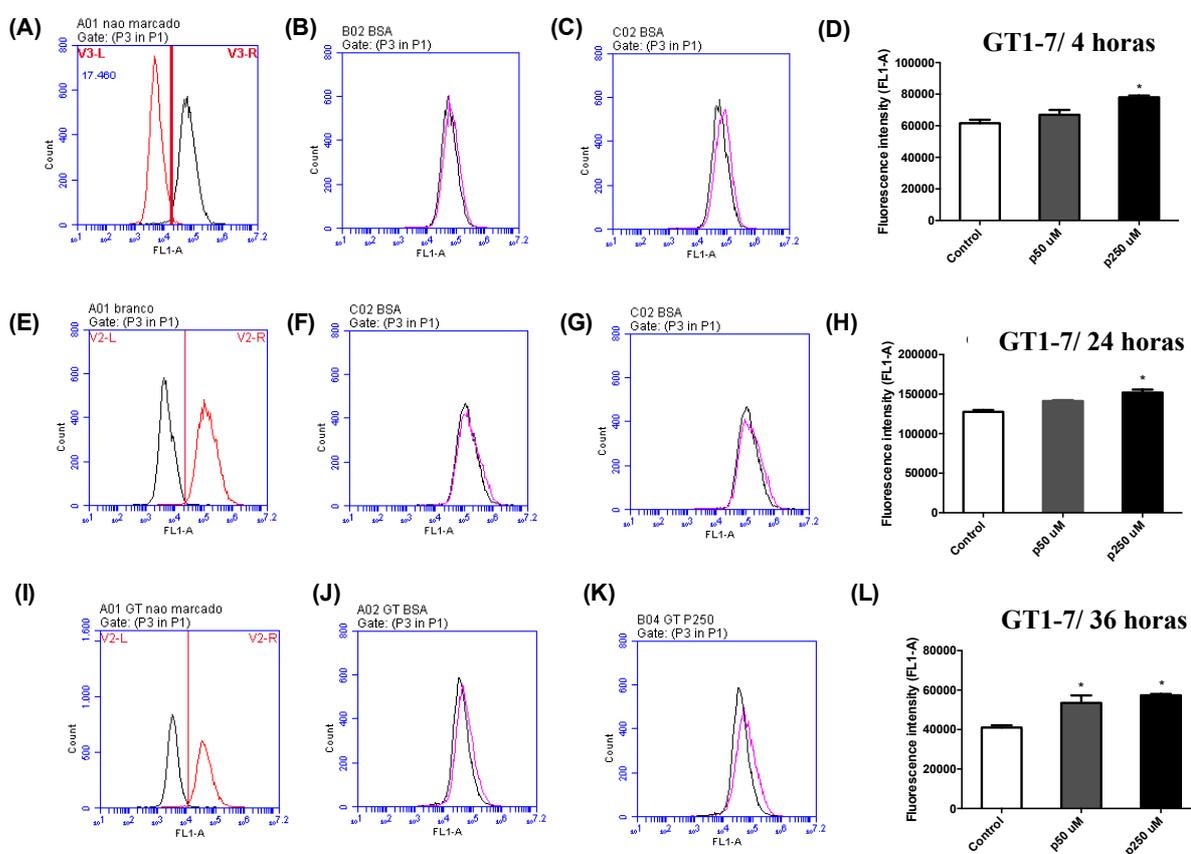


Figura 18. Avaliação da autofagia por citometria de fluxo na linhagem GT1-7. (A, E, I) Histograma representativo da comparação entre amostra não marcada (eixo V1-L, em preto) vs amostra marcada com o kit ab139484 (eixo V1-R, vermelho). **(B, C; F, G; J, K)** Intensidade de marcação em FL1 segundo número de células (controle em preto, palmitato em rosa). **(D,H, L)** Valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A. n= 1 ou 2 experimentos independentes em triplicata. Os valores representam a média ± EPM, *p<0,05. a → Palmitato vs Controle. *Anova One Way* com teste *Dunnet*.

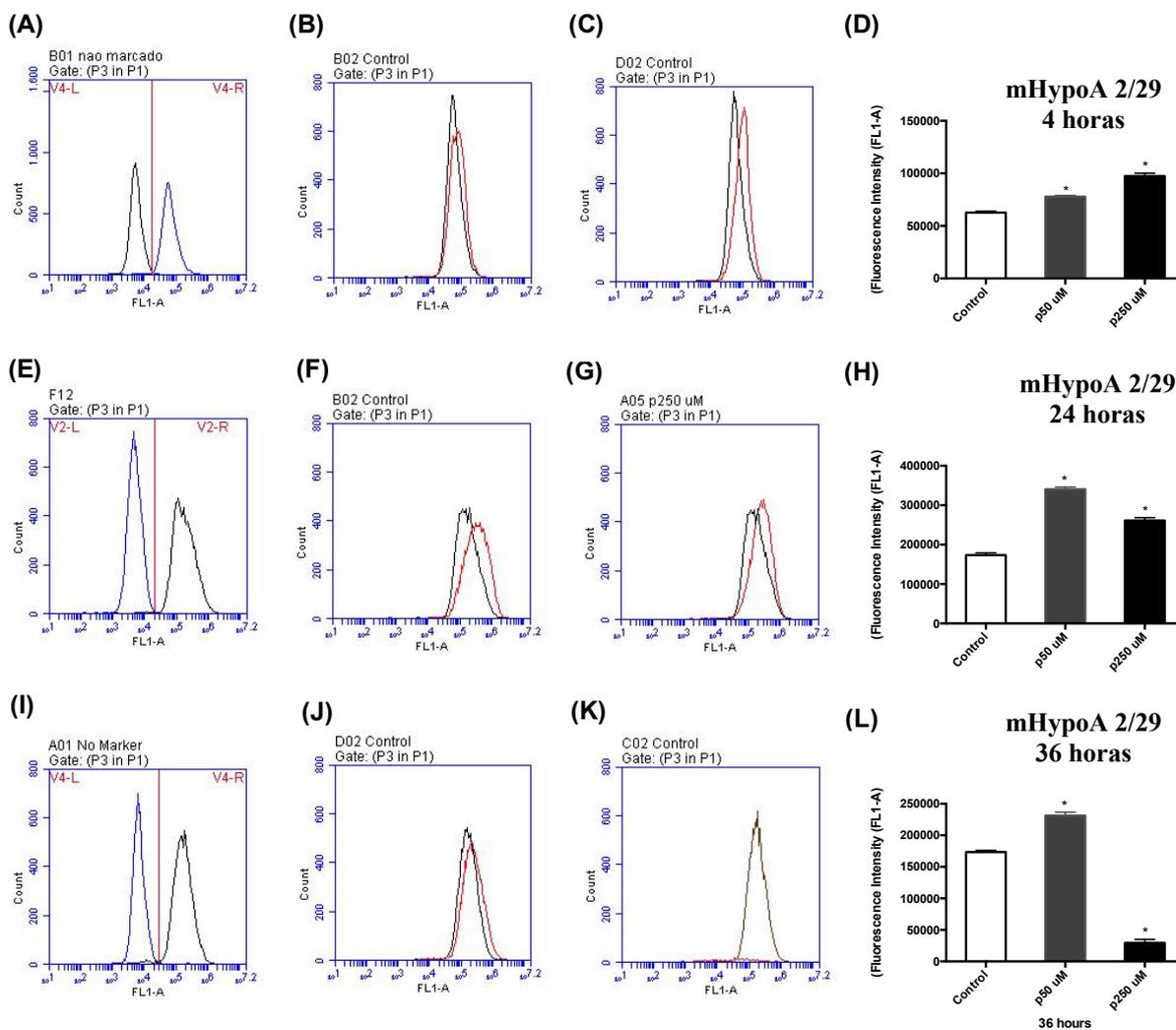


Figura 19. Avaliação da autofagia por citometria de fluxo na linhagem mHypoA 2-29. (A, E, I) Histograma representativo da comparação entre amostra não marcada (eixo V1-L, em azul) vs amostra marcada com o kit ab139484 (eixo V1-R, preto). **(B, C; F, G; J, K)** Intensidade de marcação em FL1 segundo número de células (controle em preto, palmitato em vermelho). **(D, H, L)** Valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A. n=1-3 experimentos independente em triplicata. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. Palmitato vs Controle. *Anova One Way* com teste *Dunnet*.

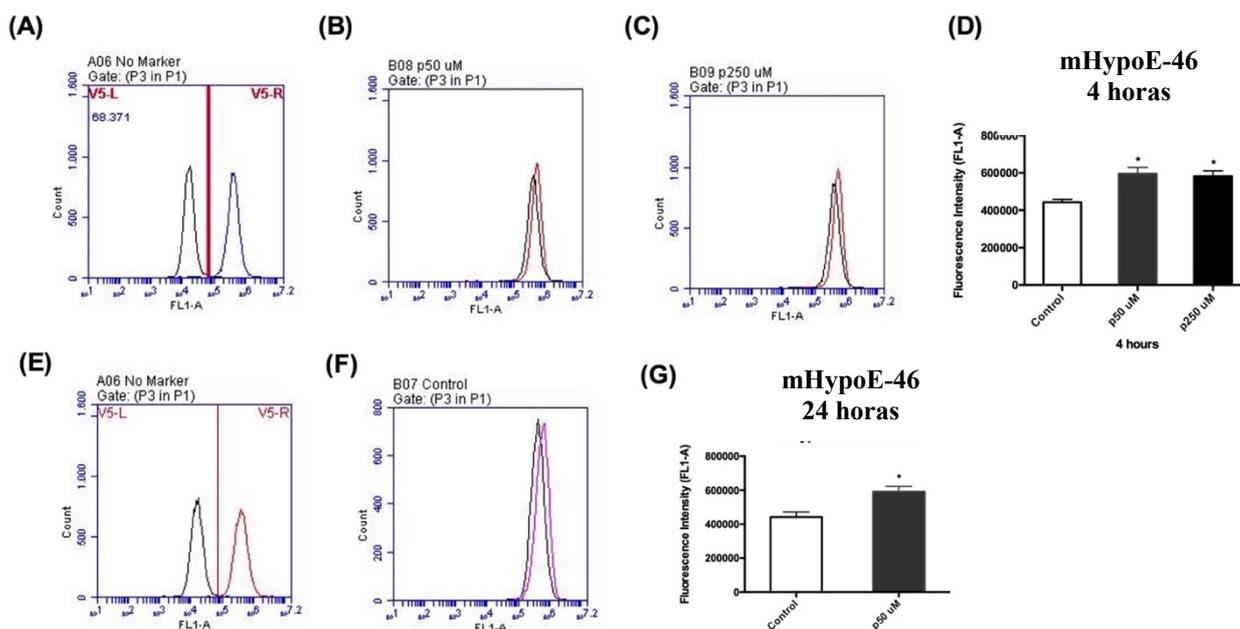


Figura 20. Avaliação da autofagia por citometria de fluxo na linhagem mHypoE-46. (A, E) Histograma representativo da comparação entre amostra não marcada (eixo V-L, em preto) vs amostra marcada com o kit ab139484 (eixo V-R, colorido). (B, C; F, G) Intensidade de marcação em FL1 segundo número de células (controle em preto, palmitato colorido). (D, H) Valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A. n=3 experimentos independentes em triplicata. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. Palmitato vs Controle. *Anova One Way* com teste Dunnet ou teste *T Student*.

Em conjunto, esses dados apresentados permitiram a identificação do papel do palmitato como potente indutor de autofagia em neurônios hipotalâmicos que co-expressam *Npy/AgRP*. Acreditamos que essa indução possa estar relacionada a tentativa celular de manter homeostasia evitando a morte celular por apoptose. No entanto, a indução de autofagia parece não conseguir evitar declínio na viabilidade celular, conforme exemplificado pelos resultados contidos nas Figuras 3 e 4, confirmando os efeitos tóxicos do palmitato as populações neuronais.

4.8 Avaliação do efeito de fatores inflamatórios na modulação de autofagia em linhagens de neurônios hipotalâmicos:

O nosso próximo passo foi avaliar se o uso de palmitato combinado ao uso de citocinas como por exemplo, *TNF- α* *IFN- γ* poderiam resultar na diminuição de autofagia da mesma forma que no hipotálamo de camundongos com obesidade induzida por HFD (Portovedo et al., 2015).

Inicialmente avaliamos o perfil de expressão gênica em resposta a este tratamento na linhagem mHypoA 2/29. Os resultados estão ilustrados na Figura 21 A-B, sendo possível perceber que o perfil de resposta inflamatória parece ser semelhante aos resultados após o tratamento com palmitato isolado.

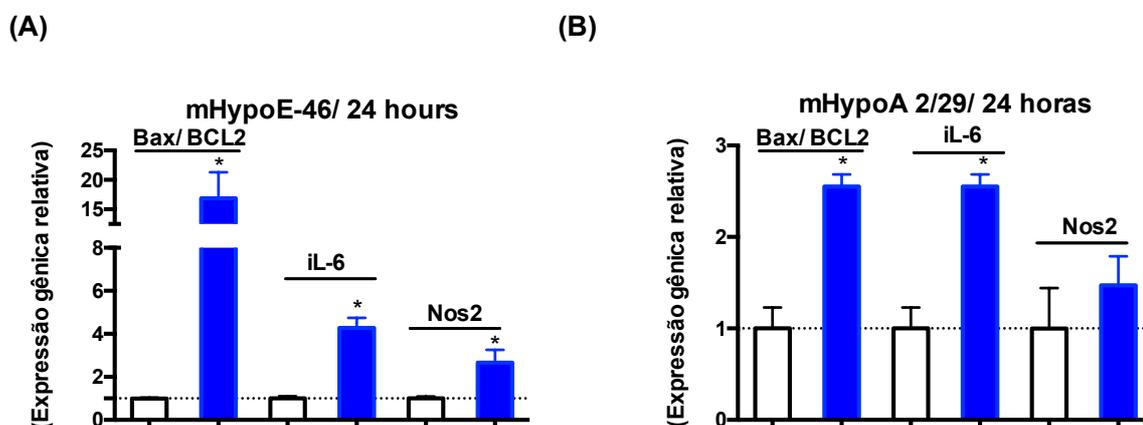


Figura 21. Avaliação da expressão gênica após o tratamento com palmitato combinado a citocinas TNF α /IFN (10 ng/ mL cada) nas linhagens mHypoA 2/29 e mHypoE-46. O tratamento com palmitato e citocinas foi realizado no tempo e concentração indicados. (A) e (B) Expressão gênica relativa de marcadores de inflamação e estresse n=2- 3 experimentos independentes, em 3-5 poços para cada período analisado. Os valores representam a média \pm EPM, *p \leq 0,05. *Teste T Student.*

Ao contrário do que esperávamos, a combinação do palmitato com TNF- α IFN- γ também resultou na indução na autofagia nas linhagens mHypoA 2-29, mHypoE-46 e GT1-7 (Figura 22), segundo a análise por citometria de fluxo.

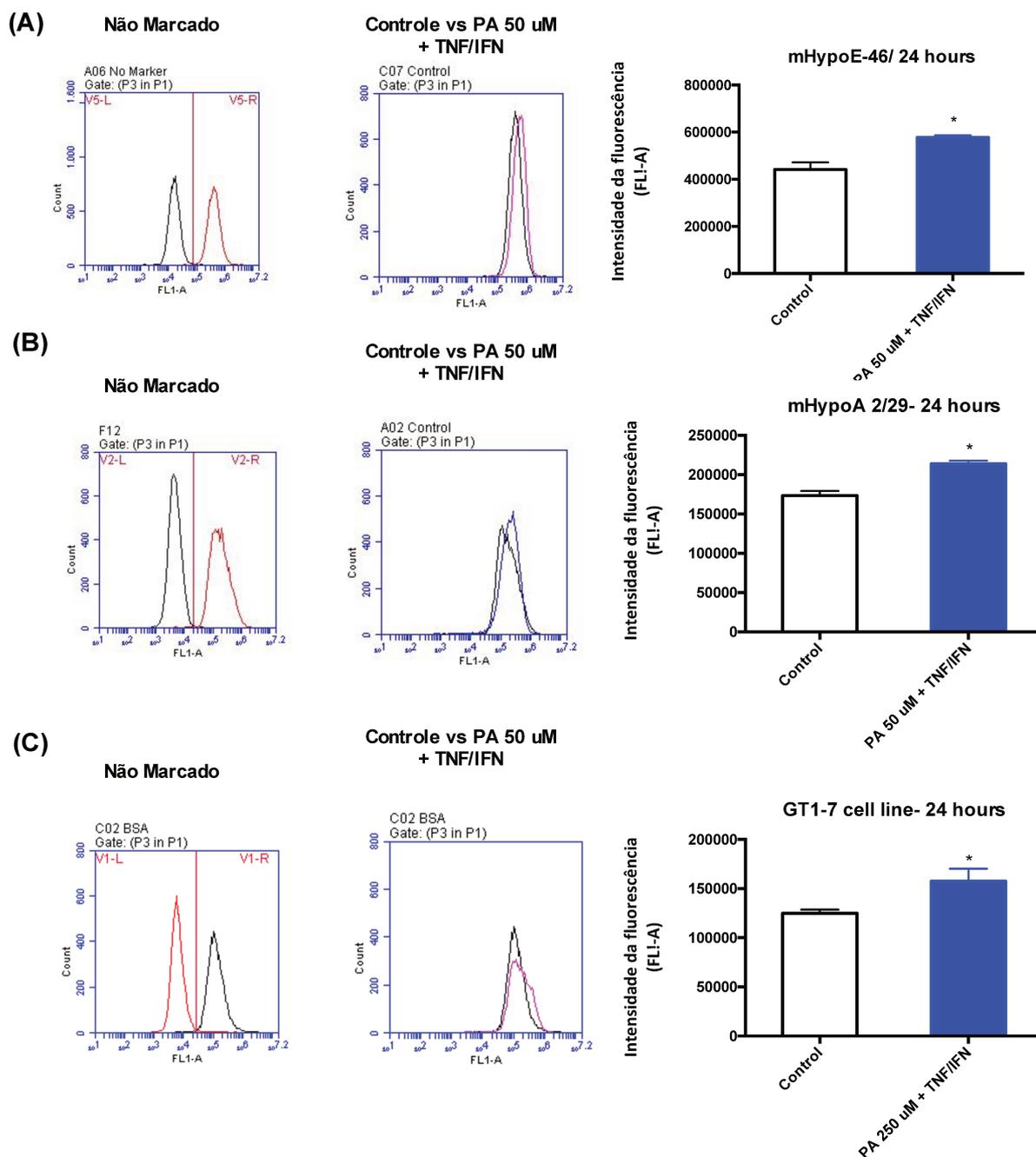


Figura 22. Características das linhagens após o tratamento com palmitato combinado ou não com TNF- α IFN- γ . (A- C, F, K) Histograma representativo da comparação entre amostra não marcada (eixo V-L) vs amostra marcada com o kit ab139484 (eixo V-R); Intensidade de marcação em FL1 segundo número de células (controle em preto, tratado colorido); Valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A. n=1-2 experimentos independentes em triplicata. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. *Teste T Student*.

Ante à importância da população microglial para a homeostasia neuronal, testamos também o envolvimento de células da micróglia na modulação de autofagia em neurônios que co-expressam *Npy/AgRP*. Para isso, conduzimos um experimento piloto de tratamento de

células microgliais da linhagem BV-2 com palmitato durante 18 horas. Após o período, o meio de cultura foi substituído por um meio sem palmitato. Aguardamos o período de 24 horas. Esse meio foi coletado e adicionado em neurônios mHypoA 2/29 por 36 horas. Após isso, avaliamos a modulação de autofagia, e não encontramos nenhuma diferença entre os grupos (Figura 23). Dessa forma, acreditamos que a interação entre neurônios e células não neuronais seja responsável pelas diferenças encontradas na modulação de autofagia no tecido hipotalâmico *versus* neurônios *Npy/AgRP* em resposta ao tratamento com lipídeos.

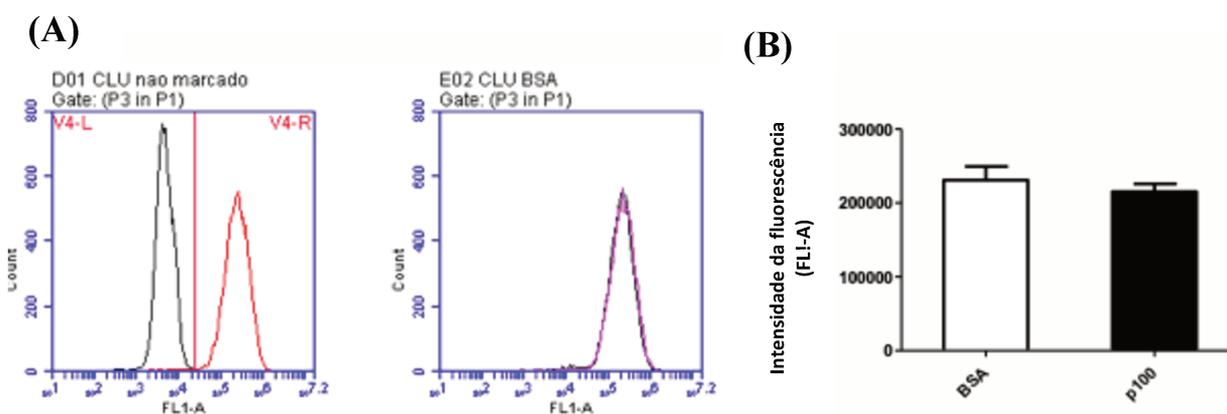


Figura 23. Meio condicionado da linhagem BV-2 tratada com palmitato (100 μ M) na linhagem de neurônios mHypoA 2/29. Histograma representativo da comparação entre amostra não marcada (eixo V-L) vs amostra marcada com o kit ab139484 (eixo V-R). **(A)** Intensidade de marcação em FL1 segundo número de células (controle em preto, tratado colorido). **(B)** Valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A. n=1 experimento independente em triplicata. N=1 experimento teste, sem estatística.

4.9 Avaliação da modulação de autofagia em resposta ao tratamento com mistura de ácidos graxos saturados e insaturados:

Para a melhor compreensão dos efeitos dos ácidos graxos encontrados nas dietas HFD na modulação de autofagia em neurônios *Npy/AgRP*, utilizamos uma mistura de ácidos graxos que simularia essa composição nutricional (oleico, palmitato, esteárico – 50 μ M concentração final). Diferente do encontrado anteriormente em relação ao uso do palmitato, não houve indução de autofagia em resposta ao tratamento com essa mistura. As respostas entre as linhagens mHypoE-46 e mHypoA 2/29 não foram homogêneas (Figura 24 A-H). Acreditamos que a origem (embrionária ou adulta) possa diferir nesse perfil de resposta.

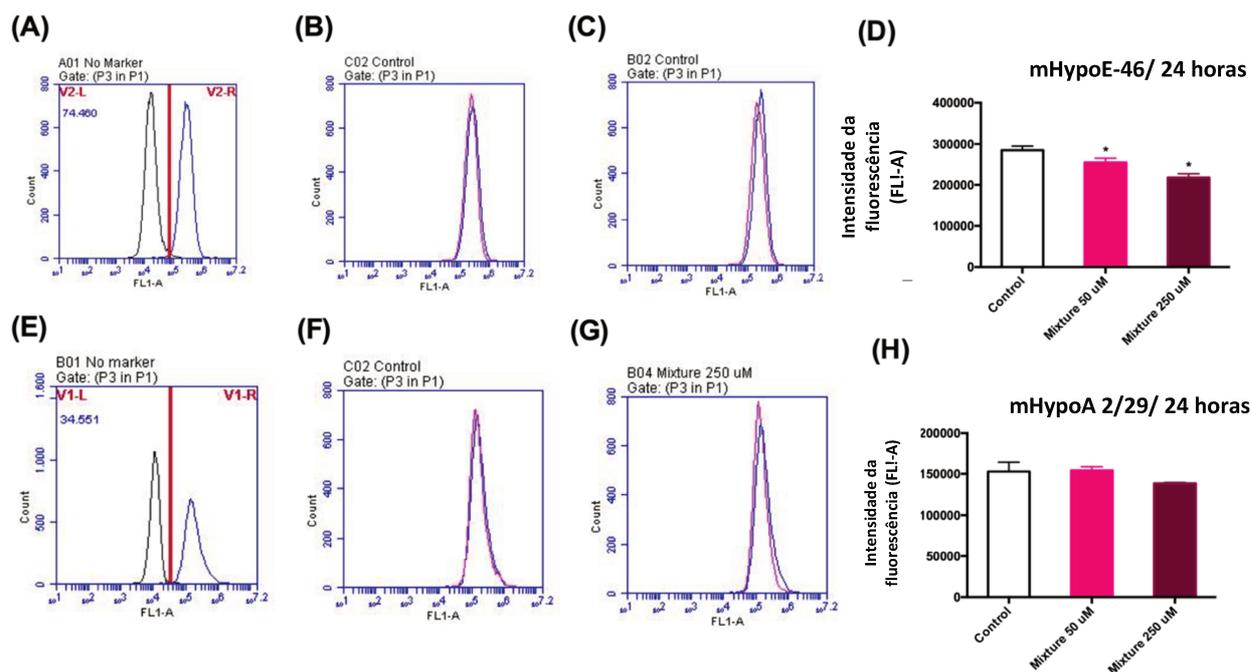


Figura 24. Avaliação do efeito da mistura de ácidos graxos na modulação de autofagia em neurônios hipotalâmicos. (A, E) Histograma representativo da comparação entre amostra não marcada (eixo V-L) vs amostra marcada com o kit ab139484 (eixo V-R). (B, C, F, G) Intensidade de marcação em FL1 segundo número de células (controle em azul, tratado colorido). (D, H) Valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A. n=1-2 experimentos independentes em triplicata. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. *Teste T Student*

4.10 Avaliação da modulação de autofagia em resposta ao tratamento com palmitoleico (PO):

Para esclarecer se a diferença na saturação da cadeia de lipídios poderia resultar em diferente perfil de modulação da autofagia, selecionamos o uso do palmitoleico, importante ácido graxo insaturado com 16 carbonos em sua cadeia. Em nossos resultados, encontramos que o tratamento com 50 μ M de palmitoleico resultou em declínio na autofagia na linhagem mHypoE-46, conforme ilustrado na Figura 25 A-C. Para investigar se o uso desse ácido graxo poderia reverter o quadro de indução na autofagia em resposta ao palmitato, realizamos o protocolo de co-tratamento entre esses dois ácidos graxos. O co-tratamento foi capaz de atenuar a indução de autofagia em resposta ao palmitato. Assim, acreditamos que a saturação da cadeia de ácidos graxos pode ser determinante para os efeitos na modulação de autofagia em neurônios que co-expressam *Npy/AgRP*.

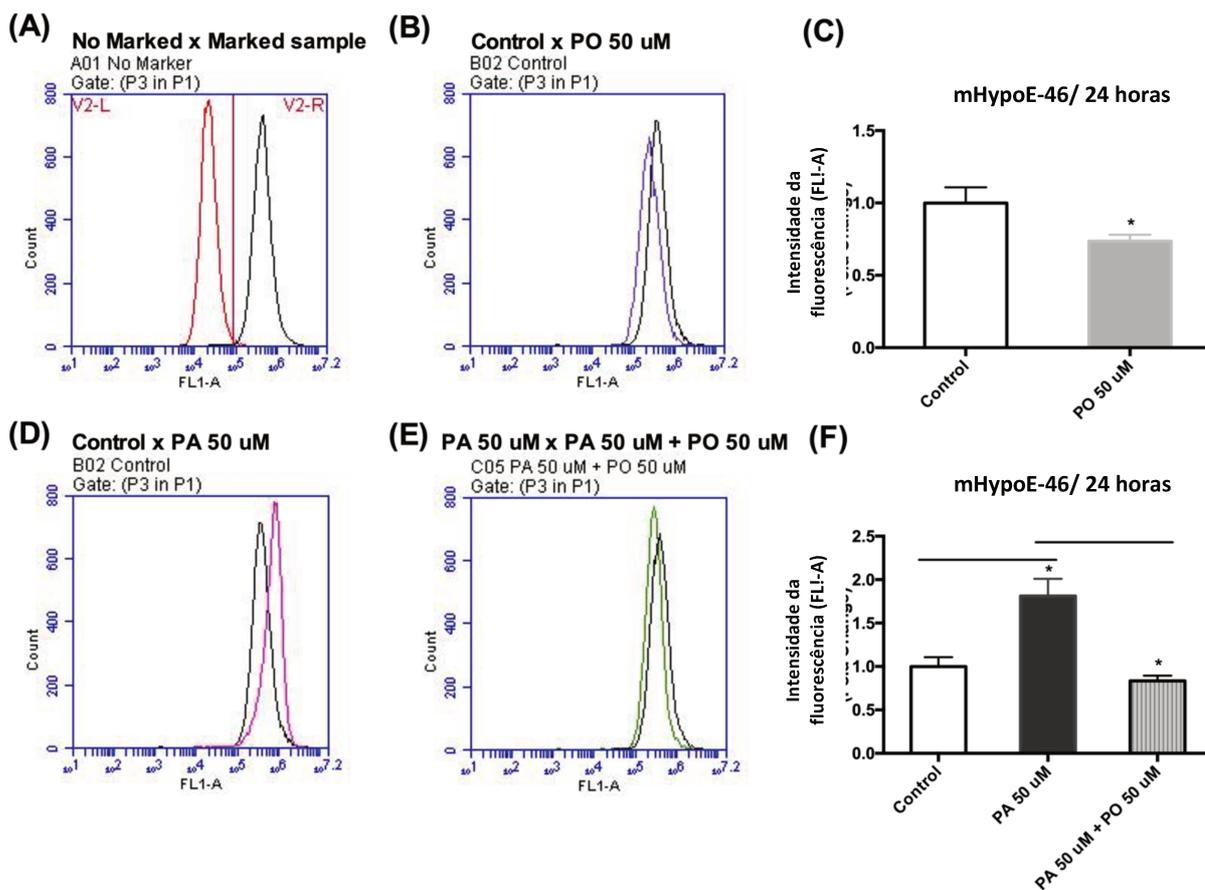


Figura 25. Avaliação do efeito da mistura de ácidos graxos na modulação de autofagia em neurônios hipotalâmicos. **(A, E)** Histograma representativo da comparação entre amostra não marcada (eixo V-L) vs amostra marcada com o kit ab139484 (eixo V-R). **(B, C, F, G)** Intensidade de marcação em FL1 segundo número de células (controle em azul, tratado colorido). **(D, H)** Valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A. $n=1-2$ experimentos independente em triplicata. Os valores representam a média \pm EPM, $*p \leq 0,05$. *Teste T Student*

4.11 Investigação do envolvimento da proteína AMPK na modulação de autofagia hipotalâmica:

Recentemente, Oh e colaboradores (2016) demonstraram que a baixa disponibilidade de glicose resulta em indução de autofagia em resposta ao aumento de AMPK. Por sua vez, a autofagia foi capaz de atuar na ingestão alimentar ao controlar a expressão de *Npy* e *POMC*. Assim, aventamos a hipótese de que o palmitato e/ou dieta hiperlipídica poderiam alterar a modulação de autofagia via a fosforilação de AMPK.

Avaliamos inicialmente conteúdo proteico de p-AMPK. Assim como a autofagia, o conteúdo proteico de p-AMPK esteve aumentado em resposta ao tratamento com palmitato nas linhagens GT1-7, mHypoE-46 e mHypoA 2/29 (Figura 26 A-C). Avaliamos também a

modulação de AMPK no modelo *in vivo* de exposição à HFD. Os resultados dieta demonstraram que o conteúdo proteico não é alterado após 1 ou 3 dias de dieta (Figura 27 A-B), sugerindo uma possível relação positiva entre a modulação de autofagia com a atividade de AMPK já que a autofagia global também não apresentou alterações neste modelo estudado.

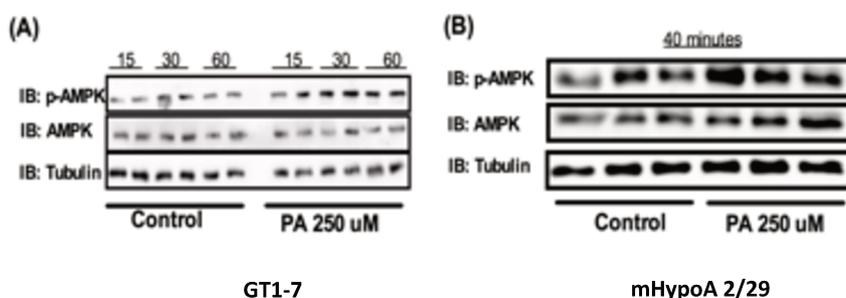


Figura 26. Avaliação do conteúdo proteico de p-AMPK *in vitro*. Os tratamentos foram realizados no período indicado. (A, B) *Imunoblotting* e gráficos representativos das proteínas p-AMPK, AMPK e tubulina. Imagem representativa, sem estatística.

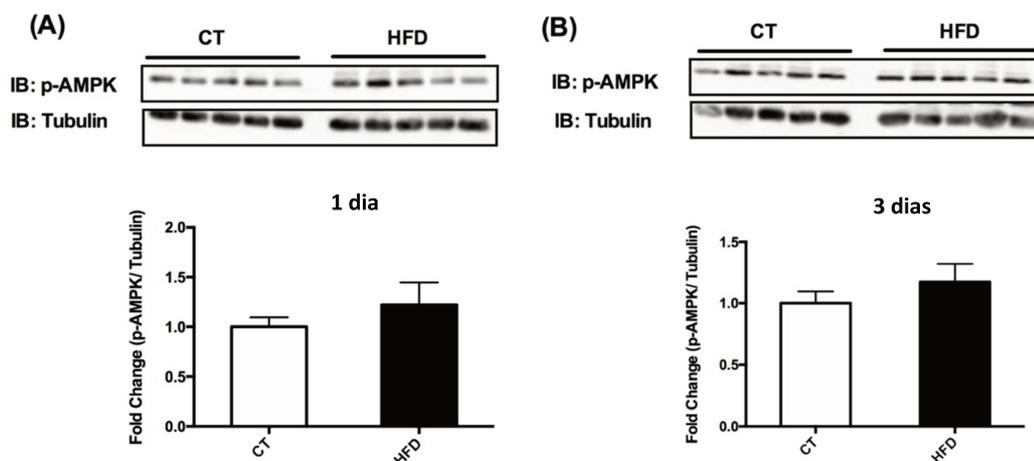


Figura 27. Avaliação do conteúdo proteico de p-AMPK após curta exposição à dieta. Os tratamentos foram realizados no período indicado. (A, B) *Imunoblotting* e gráficos representativos das proteínas p-AMPK e Tubulina. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. N=4 ou 5 animais/grupo. *Teste T Student*..

Para melhor investigar uma possível relação com a autofagia, utilizamos as drogas AICAR e Composto C (importante ativador e inibidor da fosforilação de AMPK, respectivamente). Conforme esperado, o uso de AICAR aumentou e o uso do composto C

diminuiu a atividade de autofagia em relação ao controle (Figura 28 A). O composto C não foi capaz de diminuir a atividade de autofagia (Figura 28 A). Ante a isso, inicialmente esperávamos que com o uso da droga AICAR a intensidade na indução de autofagia em resposta ao palmitato seria maior em comparação a ação sozinha do palmitato. No entanto, a combinação AICAR e palmitato não resultou em aumento na modulação de autofagia quando combinado ao tratamento isolado de palmitato (Figura 28 B).

Diferentemente do que esperávamos, o composto C combinado ao palmitato não reduziu a ativação de autofagia em relação ao tratamento isolado de palmitato (Figura 28 C). Assim, esses resultados sugerem a indução de autofagia pode estar relacionada a cascata de sinalização de p-AMPK visto que o tratamento com palmitato aumenta a fosforilação desta proteína. No entanto, agentes farmacológicos controlares da via de AMPK não são capazes de reduzir a autofagia em resposta ao tratamento com palmitato. Baseado nestes resultados, acreditamos que outros mecanismos possam ser determinantes para a influência dos lipídeos na modulação de autofagia.

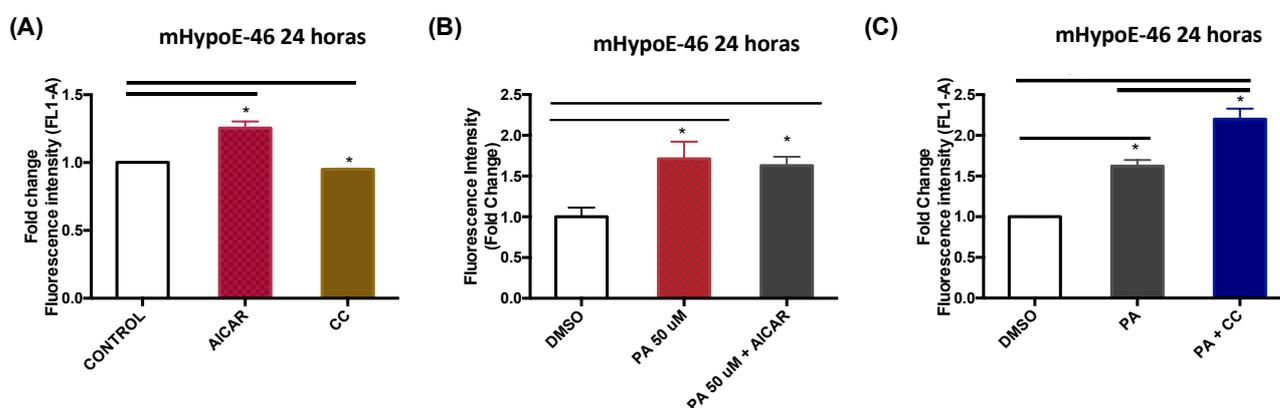


Figura 28. Teste moduladores AMPK em linhagens de neurônios hipotalâmicos. PO. (A-C) Valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A após os tratamentos indicados. n=1-2 experimentos independente em triplicata. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. *Teste T Student*

4.12 *Investigação do envolvimento do receptor TLR4 na modulação de autofagia em resposta ao palmitato em linhagens de neurônios hipotalâmicos:*

O nosso próximo passo foi avaliar o papel do receptor TLR4 na modulação de autofagia, visto que estudos recentes em macrófagos apontaram uma relação positiva entre essas vias (Xu et al., 2008). Para isso, inicialmente tratamos as células da linhagem GT1-7 com LPS e

verificamos que o LPS em neurônios diminuiu a atividade de autofagia detectada pela citometria de fluxo (Figura 29 A-B). Assim, parece que em neurônios a via do receptor TLR4 também influencia a modulação de autofagia.

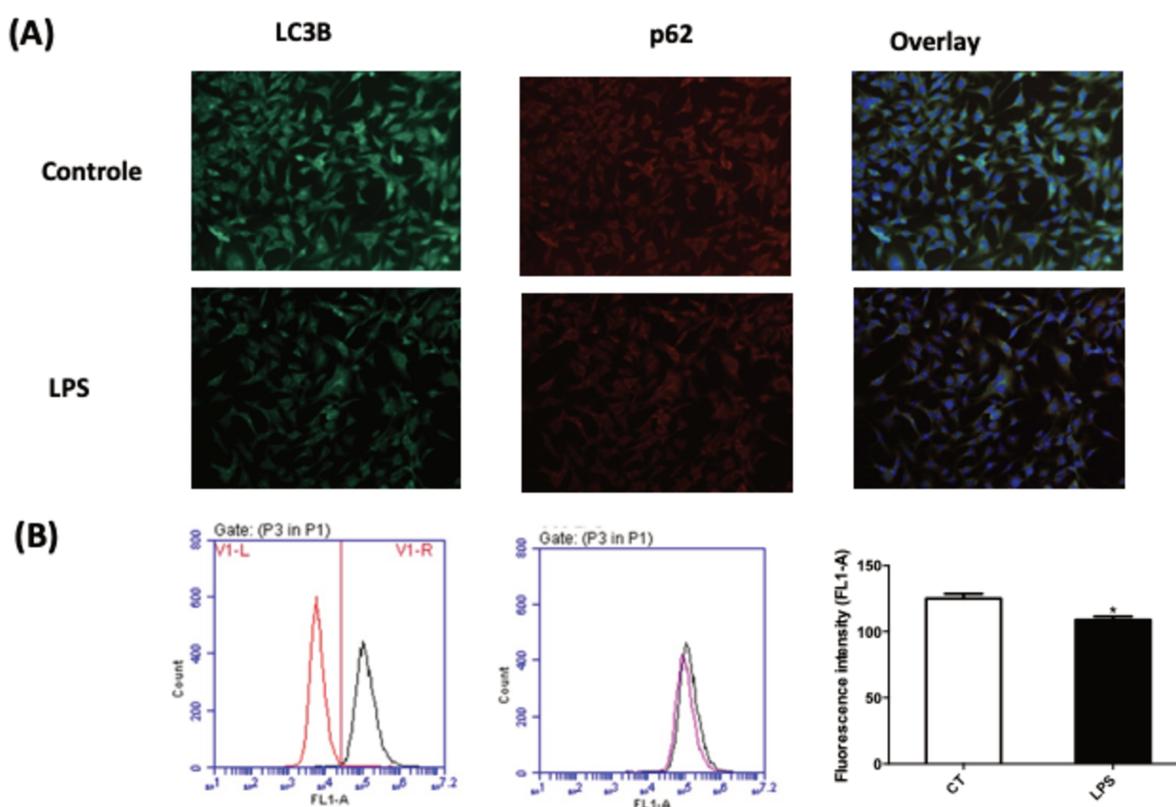


Figura 29. Modulação de autofagia em resposta ao tratamento com LPS em células GT1-7. (A) Após o tratamento por 24 horas com LPS (100 ng/mL), as células foram fixadas em metanol e a proteína LC3B foi marcada com AlexaFluor 488 e a proteína p62 foi marcada com Cy3. O núcleo foi corado com DAPI. Este experimento foi realizado uma vez. (B) Histograma representativo da comparação entre amostra não marcada (eixo V-L) vs amostra marcada com o kit ab139484 (eixo V-R); intensidade de marcação em FL1 segundo número de células (controle em preto, tratado colorido) e valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A. n=1-2 experimentos independente em triplicata. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. *Teste T Student*

O próximo passo foi avaliar a relação entre a ativação do receptor TLR4 com a modulação de autofagia em resposta ao tratamento com palmitato já que este ácido graxo é capaz de ativar a via de sinalização de TLR4 (Milanski et al., 2009). Para isso, as células neuronais foram pré-tratadas com o inibidor TAK-242. Este inibidor se liga seletivamente aos receptores TLR4 prevenindo a sua associação com as proteínas adaptadores essenciais para a transdução dos sinais da via. Conforme esperado, o uso do inibidor alterou a expressão de genes

pró-inflamatórios (Figura 30 A-B). No entanto, o uso de TAK 242 não inibiu a indução de autofagia em resposta ao palmitato (Figura 31).

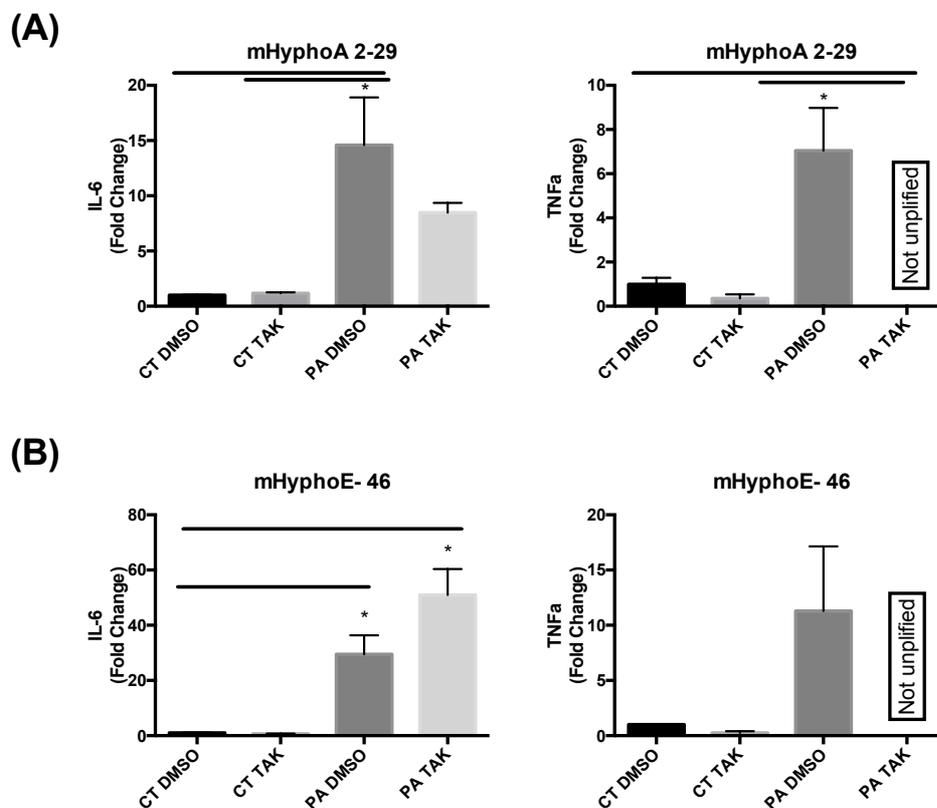


Figura 30. Expressão gênica após o uso de TAK 242, importante inibidor do receptor TLR4. O tratamento com palmitato foi realizado no tempo e concentração indicados. (A) e (B) Expressão gênica relativa de marcadores de inflamação após 24 horas de tratamento com palmitato, respectivamente. n=1-2 experimentos independentes, em 3-5 poços para cada período analisado. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. *Teste T Student*.

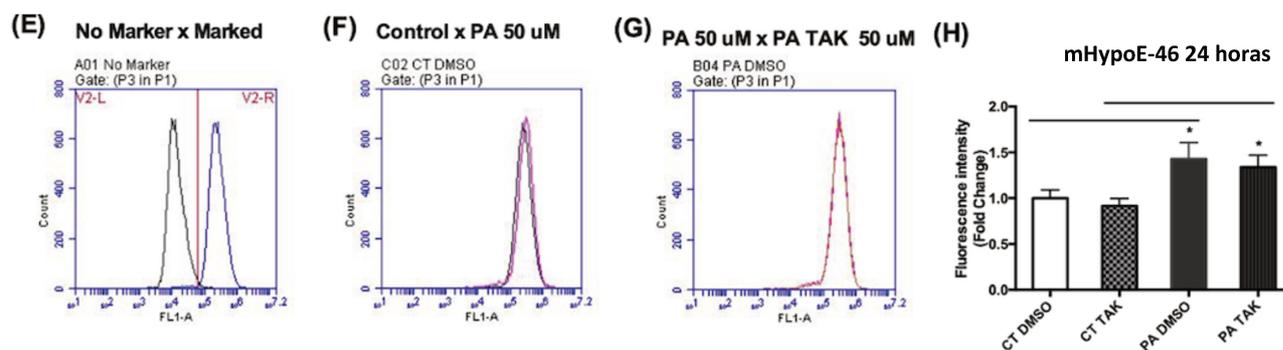


Figura 31. Uso do inibidor TAK-242 para investigar o envolvimento do receptor TLR4 na modulação de autofagia em neurônios hipotalâmicos. (A) Histograma representativo da comparação entre amostra não marcada (eixo V-L) vs amostra marcada com o kit ab139484 (eixo V-R). (B, C) Intensidade de marcação em FL1 segundo número de células (controle em preto, tratado colorido). (D) Valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A. n=1-2 experimentos independente em triplicata. Os valores representam a média \pm EPM, * $p \leq 0,05$. *Teste T Student*

Assim, embora o receptor TLR4 seja ativado em resposta ao uso de ácidos graxos saturados em células neuronais, e, isso desencadeie “ciclo vicioso” que exacerba a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a modulação de autofagia em resposta ao tratamento com palmitato não parece ser controlada primordialmente por essa via.

4.13 Investigação do envolvimento da síntese de de novo ceramidas na modulação de autofagia em resposta ao palmitato em linhagens de neurônios hipotalâmicos:

Os esfingolípídeos possuem importante papel estrutural na composição das membranas celulares, sendo que as ceramidas servem como importante lipídeo bioativos em uma variedade de processos celulares como crescimento, diferenciação e apoptose (Ji et al., 2017). Assim, aventamos a hipótese final de que essa via poderia estar envolvida na ativação de autofagia em resposta ao palmitato em células neuronais que co-expressam *Npy/AgRP*.

Testamos a habilidade do palmitato em induzir a expressão gênica de enzimas envolvidas no processo de *de novo* ceramidas em células neuronais. Os resultados contidos na Figura 32 mostram que o palmitato após 24 horas aumenta a expressão da enzima SPT (*serine palmitoyl transferase*) em suas duas sub-unidades em relação ao grupo controle.

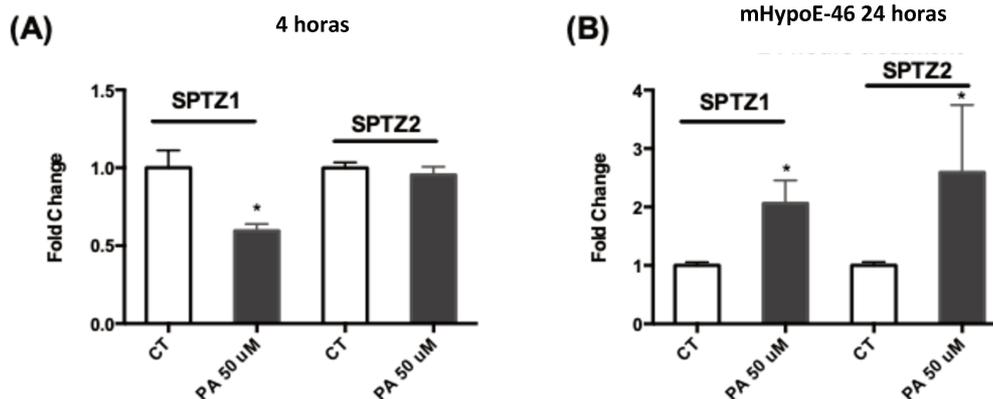


Figura 32. Expressão gênica de enzimas envolvidas na síntese de *de novo* ceramidas. O tratamento com palmitato foi realizado no tempo e concentração indicados. (A) e (B) Expressão gênica relativa de marcadores de inflamação após 24 horas de tratamento com palmitato, respectivamente. $n=3$ experimentos independentes. Os valores representam a média \pm EPM, $*p \leq 0,05$. *Teste T Student*.

Para avaliar uma possível relação com a autofagia, utilizamos o inibidor farmacológico da enzima SPT conhecida como miriocina. Esta inibição foi capaz de atenuar a indução de autofagia em resposta ao tratamento com palmitato ao comparar os efeitos do ácido graxo sozinho (Figura 33).

Com esses resultados, acreditamos que as alterações induzidas pelo palmitato no metabolismo de ceramidas em células neuronais se relacione positivamente com o aumento de autofagia. Talvez a indução de autofagia seja uma tentativa para manter a homeostasia na função neuronal frente ao estímulo extremamente tóxico proporcionado pelo palmitato. No entanto, parece que essa indução na modulação de autofagia não é capaz de impedir os estímulos negativos ao metabolismo neuronal visto o declínio na viabilidade celular após a exposição ao palmitato, conforme retratado em nossos primeiros resultados.

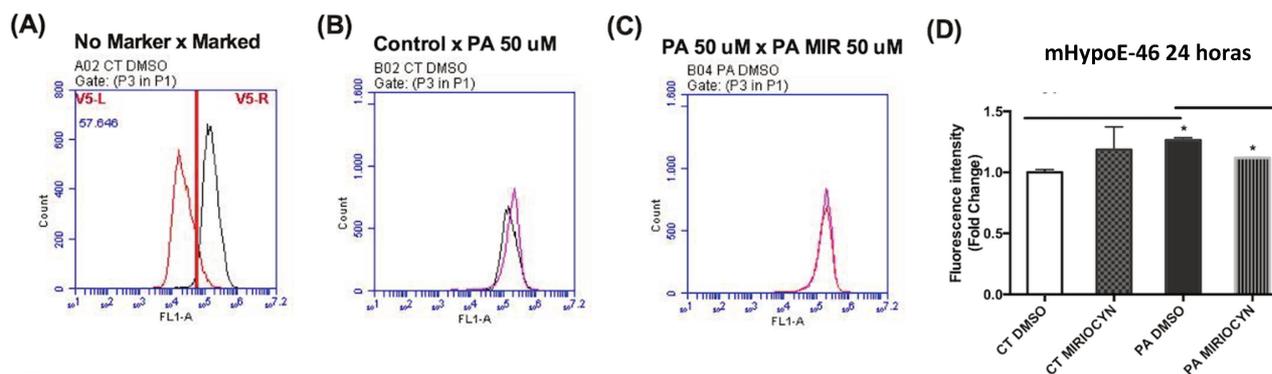


Figura 33. Uso de droga miriocina (10 μ M) para inibição da síntese de *de novo* ceramidas e investigação da modulação de autofagia em neurônios hipotalâmicos. (A) Histograma representativo da comparação entre amostra não marcada (eixo V-L) vs amostra marcada com o kit ab139484 (eixo V-R). **(B, C)** Intensidade de marcação em FL1 segundo número de células (controle em preto, tratado colorido). **(D)** Valores da mediana da intensidade de fluorescência em FL1-A. n=3 experimentos independente em triplicata. Os valores representam a média \pm EPM, *p \leq 0,05. *Teste T Student*

5. DISCUSSÃO:

Nos últimos anos, estudos envolvendo a relação entre autofagia e lipídios já revelaram uma importante relação bidirecional (Singh et al., 2009; Singh & Cuervo, 2012; Jaishy & Abel, 2016). Assim, a autofagia é capaz de degradar lipídeos em um processo conhecido como “*lipofagia*” (Singh et al 2009, Singh 2010). Inicialmente descrito em células hepáticas e que ocorre também em neurônios, as vesículas autofágicas em resposta a sinalização celular, como por exemplo, diante da privação de nutrientes, são capazes de englobar os “*droplets*” de lipídeos de modo a gerar degradação e liberação de ácidos graxos livres os quais por sua vez podem ser utilizados para gerar energia celular (Singh et al., 2009; Singh & Cuervo, 2012; Jaishy & Abel, 2016). Por outro lado, os ácidos graxos por si também são capazes de atuar no processo de autofagia, incluindo a indução ou supressão dependendo do tipo celular avaliado (Singh et al., 2009; Singh & Cuervo, 2012; Jaishy & Abel, 2016).

Os relatos sobre a relação de autofagia e lipídios até o presente momento apontam que a diminuição neste processo no tecido hipotalâmico ocorre após exposição crônica à HFD (16 semanas) (Meng & Cai, 2011; Thaler et al., 2012 e Portovedo et al., 2015). No tecido hepático de ratos alimentados com HFD por 2 semanas o processo autofágico foi aumentado (Papácková et al., 2012). No entanto, semelhante ao tecido hipotalâmico, a autofagia está diminuída após a exposição crônica à ingestão de HFD no fígado (Papácková et al., 2012).

Inicialmente, em nosso modelo encontramos que a exposição aguda aos lipídios (1, 3 dias e tratamento i.c.v) foi capaz de alterar a expressão de genes envolvidos na indução do processo autofágico, sem, no entanto, alterar a atividade global do processo no tecido hipotalâmico. Talvez isso ocorra como tentativa de combater os efeitos deletérios do excesso de lipídios ao tecido hipotalâmico.

No grupo dieta encontramos aumento na expressão de *BCN* (gene para a proteína Beclin-1). A proteína Beclin 1 é essencial para a formação da estrutura do autofagossomo visto que a sua ativação promove a produção de fosfatidilinositol de classe 3 (PI3), facilitando a extensão da membrana, recrutamento dos alvos e maturação da estrutura. Ainda, a proteína possui uma importante relação com o processo de apoptose visto que em um de seus domínios ela é capaz de se ligar a Bcl2 (Kang et al., 2011). Encontramos também, aumento na expressão gênica de *SQSTM1* (gene para a proteína p62). A literatura descreve que a proteína p62 foi a primeira proteína com função adaptadora descrita em relação a autofagia (Maloney et al., 2013) sendo que os níveis de p62 geralmente são inversamente correlacionados com a degradação de autofagia. Além disso, a perda de genes *Atgs* ou outros fatores requeridos para a fusão do autofagossomo com o lisossomo resultam em acúmulo de agregados marcados por p62 (Maloney et al., 2013).

Por sua vez, o palmitato foi capaz de induzir a expressão gênica de *Lamp1* e *Rab7*, associado à diminuição na expressão de *MAPLC3* (gene para a proteína LC3). *Lamp1* é um importante marcador de lisossomos (Cheng, 2018) e *Rab7*, faz parte da família de GTPases, que em células de mamíferos é essencial para a maturação de autofagossomos (Kuchitsu & Fukuda, 2018). Dessa forma, o palmitato pareceu atuar em genes diferentes quando comparados aos efeitos agudos da exposição à HFD, sugerindo que a composição da dieta *versus* o efeito isolado de ácidos graxos, podem possuir alvos distintos. No entanto, ainda não há relatos em literatura que evidenciem esses efeitos. A avaliação dos mecanismos responsáveis por essa distinção talvez seja interessante em projetos futuros do grupo de pesquisa.

Encontramos também que o palmitato foi capaz de alterar a expressão gênica de *Npy/AgRP*. Dessa forma, na continuidade dos experimentos utilizamos linhagens celulares que co-expressam esses neuropeptídios para o melhor entendimento do papel da relação entre lipídeos e autofagia em neurônios que controlam a ingestão alimentar. A relação entre autofagia e expressão de *Npy* já foi descrita em literatura. Por exemplo, Azeiteira e colaboradores, 2015 demonstraram em seu estudo que animais com superexpressão para *Npy* apresentaram indução na autofagia neuronal. Recentemente, Hernández-Cáceres e colaboradores (2019), publicaram em seu estudo que ácidos graxos saturados como o palmitato e o ácido esteárico são capazes de

inibir a autofagia em linhagens de neurônios que co-expressam POMC, sendo que a modulação de autofagia foi correlacionada com resistência à insulina.

Neste trabalho, encontramos também que o tratamento com PA utilizando soro bovino fetal (2%) alterou a viabilidade celular bem como induziu o processo autofágico em linhagens de neurônios hipotalâmicos, segundo os dados de conteúdo proteico bem como intensidade de fluorescência detectados pelo citometro de fluxo. Sabe-se que a autofagia pode estar relacionada com morte celular por mecanismos ainda não totalmente compreendidos. A indução de autofagia parece ser um mecanismo adaptativo da célula para se proteger frente ao dano celular. Por exemplo, em neurônios da linhagem GT1-7 após a privação de nutrientes (por meio da retirada do soro bovino fetal), o PA foi capaz de aumentar a autofagia (Kaushik et al., 2011). No entanto, a ativação exacerbada de autofagia é seguida pela ativação de vias de morte celular (Liu *et al.*, 2015).

Assim, Cai e colaboradores (2014) ao analisarem os efeitos da exposição de palmitato em hepatócitos encontraram indução no processo autofágico bem como apoptose. Ao inibir a autofagia por meio do pré-tratamento com cloroquina e/ou Atg5shRNA os autores encontraram que o aumento de apoptose ante à exposição ao palmitato foi ainda maior, reforçando o papel protetor da autofagia. Da mesma forma, em neurônios do hipocampo o tratamento com minociclina foi capaz de ativar a autofagia via AMPK acompanhada pela redução nos níveis de apoptose (Zhang et al., 2018).

Conforme descrito previamente, o uso crônico de HFD é responsável por diminuir a autofagia hipotalâmica em modelos de camundongos da linhagem *Swiss* (Meng & Cai, 2011; Portovedo *et al.*, 2015). No entanto, conforme descrito acima, encontramos aqui que em linhagens de neurônios hipotalâmicos, o tratamento com palmitato resulta na indução de autofagia. As diferenças entre os resultados obtidos em *in vitro* e *in vivo* podem ser explicadas baseando-se no tempo de exposição ao palmitato. Por exemplo, esse tratamento representa um efeito agudo desse ácido graxo nos neurônios hipotalâmicos. Outros tempos de exposição (> 36 horas) são necessários para a investigação da modulação de autofagia. Todavia, acreditamos que a viabilidade celular diminua ainda mais com o aumento no tempo de exposição de modo a interferir negativamente em nossas análises.

Adicionalmente, o tecido hipotalâmico *in vivo* contém não apenas neurônios como também células da glia, tais como a micróglia. Dados recentes apontam ainda o papel de células derivadas da medula óssea na inflamação hipotalâmica durante a obesidade (Valdearcos *et al.*, 2017). Assim, células do sistema imune presentes na região hipotalâmica em resposta ao uso de HFD são capazes de atuar na secreção de citocinas pró-inflamatórias como *TNF- α* e *IFN- γ* ,

entre outras. Isso gera um ciclo vicioso durante a obesidade em que tanto os ácidos graxos saturados (predominantemente de cadeia longa) quanto às próprias citocinas liberadas serão capazes de ativar *de novo* os receptores de membrana ativando a cascata de sinalização intracelular. Aqui testamos o co-tratamento entre palmitato e *TNF- α /IFN- γ* para investigar se isso resultaria em um perfil distinto na modulação de autofagia. No entanto, este tratamento também induziu o processo autofágico, levando-nos a acreditar que os efeitos do palmitato são determinantes para essa indução.

Assim, as células não neuronais compreendem cerca de 50% dos tipos presentes no cérebro (Su et al., 2016). As células da micróglia correspondem as células imunes residentes no cérebro com alta capacidade fagocitária sendo que população microglial pode existir em dois diferentes estados que incluem o estado de “descanso” ou inativo e um estado ativo. Dessa forma, a população microglial ao se manter em constante comunicação com os neurônios pode exercer tanto o papel neuroprotetor ao fagocitar debris celulares ou microorganismos invasores; atuar no remodelamento do ambiente pré-sináptico. Assim, essa população pode atuar na indução ou perpetuar a neurotoxicidade ao secretar fatores imunológicos sob estímulo crônico (Kandel et al., 2000; Ladeby et al., 2005; Su et al., 2016).

Perante à importância da população microglial para a homeostasia neuronal, testamos também o envolvimento de células da micróglia na modulação de autofagia em neurônios que co-expressam *Npy/AgRP*. Para isso, utilizamos o meio condicionado de células microgliais para o tratamento dos neurônios sendo que não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos. Dessa forma, acreditamos que a interação entre neurônios e células não neuronais e os possíveis fatores solúveis liberados possam ser responsáveis pelas diferenças encontradas na modulação de autofagia no tecido hipotalâmico *versus* neurônios *Npy/AgRP* em resposta ao tratamento com lipídeos. Além disso, o PA pode atuar diretamente em receptores neuronais que possivelmente não foram ativados com o meio condicionado o qual apesar de rico em fatores inflamatórios, não apresentou neste caso, ácido graxo.

Nos últimos anos, muitos grupos de pesquisa avaliaram em outros tipos celulares os efeitos de ácidos graxos livres na modulação de autofagia. Por exemplo, o PA em células beta-pancreáticas também resulta na indução de autofagia, o que protege da morte celular por apoptose (Wang & Nie, 2015). No entanto, em linhagens de neurônios hipotalâmicos que expressam *Pomc*, o palmitato reduz a autofagia e compromete a sinalização de insulina (Hernández-Cáceres et al., 2019). Em células de hepatócitos bem como células cancerígenas, os ácidos graxos mono e poli-insaturados também resultam em indução na autofagia (Wang & Nie, 2015). Assim, a identificação do papel específico dos ácidos graxos na autofagia nos

diversos tipos celulares envolvidos parece contribuir para eventos patológicos relacionados as doenças metabólicas altamente prevalentes na população mundial.

Aqui encontramos que a mistura de ácidos graxos que simularia a composição da dieta hiperlipídica não resultou na indução de autofagia, o que possivelmente estaria ligado à nossa hipótese de que o palmitato e sua sinalização intracelular específica (ativação de ceramidas e/ou vias inflamatórias) seriam determinantes para o aumento no processo autofágico.

Em continuidade, para esclarecer se a diferença na saturação da cadeia de lipídeos poderia resultar em diferente perfil de modulação da autofagia, selecionamos o uso do palmitoleico, importante ácido graxo insaturado com 16 carbonos em sua cadeia. O palmitoleico pode ser sintetizado pela desaturação do palmitato, em uma reação catalisada pela enzima SCD1 (*stearoyl-CoA desaturase 1*) (De Souza et al., 2017). Assim, parece que esse ácido graxo pode produzir respostas anti-inflamatórias em alguns tipos celulares como os macrófagos e células endoteliais (Chan et al., 2015; De Souza et al., 2017). Além disso, o tratamento com palmitoleico parece melhorar a sensibilidade ao hormônio insulina bem como atenuar a esteatose hepática em camundongos com obesidade induzida por HFD (Guo et al., 2012). Aqui encontramos que o uso desse ácido graxo leva à diminuição no processo autofágico em neurônios que co-expressam *Npy/AgRP*, talvez corroborando a ideia de que a autofagia é induzida em resposta ao tratamento com palmitato como um possível mecanismo celular para a proteção e manutenção da viabilidade neuronal. Isso parece ser reafirmado ao analisar os dados referentes ao efeito do palmitoleico na inibição da indução de autofagia em resposta ao palmitato.

Para esclarecer as vias intracelulares envolvidas na indução de autofagia em resposta ao tratamento com palmitato em linhagens de neurônios hipotalâmicos que co-expressam *Npy/AgRP*, avaliamos inicialmente o envolvimento da proteína AMPK. Recentemente, Oh e colaboradores (2016) demonstraram que a baixa disponibilidade de glicose resulta em indução de autofagia em resposta ao aumento de AMPK. Por sua vez, a autofagia foi capaz de atuar na ingestão alimentar ao controlar a expressão de *Npy* e *POMC*. Os nossos resultados *in vivo* e *in vitro* demonstraram que quando a autofagia está inalterada, os níveis de p-AMPK permanecem inalterados, bem como quando há indução na autofagia, é encontrado aumento na fosforilação de p-AMPK. Assim, acreditamos que a indução de autofagia pode estar relacionada à cascata de sinalização de AMPK. No entanto, agentes farmacológicos controlares da via de AMPK não são capazes de alterar a autofagia em resposta ao tratamento com palmitato. Portanto, acreditamos que outros mecanismos possam ser determinantes para a influência dos lipídeos na modulação de autofagia.

Dados apontam que o receptor da imunidade inata TLR4 foi descrito como sensor ambiental para ativação da autofagia e proteção celular (Xu et al., 2008). Ao estudar autofagia em macrófagos de animais e cultura primária de macrófagos alveolares de humanos, esse autor utilizou o LPS (lipopolissacarídeo) para a ativação de TLR4 e verificou indução de autofagia nessas células. Por outro lado, após a produção de células deficientes para TLR4 houve inibição na atividade autofágica estimulada por LPS, exemplificando a importância da conexão entre esses mecanismos celulares. Aqui em nosso estudo o LPS foi capaz de diminuir a autofagia em neurônios hipotalâmicos que co-expressam *Npy/AgRP*. Além disso, ao inibir farmacologicamente a via de sinalização de TLR4, a autofagia ainda foi induzida em resposta ao tratamento com palmitato. Assim, acreditamos que embora o receptor TLR4 seja ativado em resposta ao uso de ácidos graxos saturados em células neuronais, e, isso desencadeie “ciclo vicioso” que exacerba a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a modulação de autofagia em resposta ao tratamento com palmitato não parece ser controlada primordialmente por essa via.

Por fim, avaliamos o envolvimento da via de *de novo* ceramidas como potencial alvo para a indução de autofagia em resposta ao palmitato. Os esfingolípideos possuem importante papel estrutural na composição das membranas celulares, sendo que as ceramidas servem como importante lipídeo bioativos em uma variedade de processos celulares como crescimento, diferenciação e apoptose (Ji et al., 2017). Em tecidos periféricos as ceramidas são importantes mediadores da lipotoxicidade: elas se acumulam em tecidos sensíveis ao hormônio insulina e células β pancreáticas durante o desenvolvimento da obesidade, sendo que os seus níveis intracelulares se correlacionam com a resistência à insulina e apoptose das células β pancreáticas. Em camundongos, as enzimas de *de novo síntese* de ceramidas são expressas tanto no hipotálamo quanto no hipocampo (Cruciani-Guglielmacci et al., 2017).

Interessante, ao inibir a via de síntese de *de novo* ceramidas por meio do uso da droga miriocina, encontramos que o tratamento com palmitato combinado a este fármaco reduziu a indução na autofagia provocada pelo uso isolado de palmitato. A inibição da síntese de ceramidas parece ser interessante também para a sensibilidade à insulina visto que ratos obesos da linhagem Zucker ao receberem tratamento i.c.v com miriocina apresentaram melhora em teste de tolerância à glicose (Campana et al., 2018). Assim, acreditamos as alterações induzidas pelo palmitato no metabolismo de ceramidas em células neuronais se relacione positivamente com o aumento de autofagia. Talvez a indução de autofagia seja uma tentativa para manter a homeostasia na função neuronal diante do estímulo extremamente tóxico proporcionado pelo palmitato. No entanto, parece que a indução na modulação de autofagia não foi capaz de

impedir os estímulos negativos ao metabolismo neuronal visto o declínio na viabilidade celular após a exposição ao palmitato retratado em nossos primeiros resultados.

6. CONCLUSÕES:

Os resultados contidos nesse trabalho demonstraram que a autofagia global no tecido hipotalâmico foi preservada em resposta ao tratamento agudo com lipídios, embora alguns marcadores de expressão gênica já se apresentaram modulados. Acreditamos que populações não neuronais possam contribuir para a manutenção do processo autofágico visto a sua essencialidade para a homeostasia no balanço energético e sinalização de insulina amplamente investigados em literatura. Ao investigar o papel isolado de lipídios em neurônios que co-expressam *Npy/AgRP*, encontramos que o palmitato é um potente indutor do processo autofágico. Este ácido graxo é também capaz de ativar síntese de ceramidas, inflamação e estresse, associados ao declínio na viabilidade celular. Em oposição, ao investigar o papel de um ácido graxo insaturado, o palmitoleico, encontramos redução na atividade de autofagia. Encontramos que o co-tratamento com o palmitoleico é capaz de atenuar a indução de autofagia em resposta ao palmitato. Avaliamos que o aumento na autofagia em resposta ao palmitato parece ser via mTORC1, visto que a fosforilação da proteína p-S6 esteve reduzida. O nível de fosforilação de AMPK também foi maior em neurônios hipotalâmicos em resposta ao tratamento com palmitato. No entanto, o uso de drogas como AICAR e Composto C não alteraram a indução na atividade de autofagia frente ao uso de palmitato. O bloqueio da síntese de *de novo* ceramidas, e, não de ativação do receptor TLR4, foi capaz de atenuar a indução na autofagia em resposta ao palmitato. Assim, concluímos nesse projeto que o grau de saturação da cadeia de ácidos graxos parece ser responsável por diferentes perfis de modulação de autofagia neuronal. Ainda, a síntese de ceramidas parece ser importante alvo promissor relacionado à ativação de autofagia em resposta ao palmitato. O estabelecimento da relação entre lipídios dietéticos e modulação de autofagia em neurônios que controlam a ingestão alimentar pode representar importante passo na identificação de alvos terapêuticos para o controle da obesidade, importante problema de saúde pública da atualidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Aderem A., Ulevitch R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782–787.
- Ahima, R. S. Digging deeper into obesity. *The Journal of clinical investigation*. *J Clin Invest*. 2011 Jun 1; 121(6): 2076–2079.
- Araujo E. P., Torsoni M. A., Velloso L. A. Hypothalamic inflammation and obesity. *Vitam Horm*. 2010;82:129–143.
- Arsham AM, Neufeld TP. Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr Opin Cell Biol*. 2006; 18(6):589-97.
- Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature* 466(7302): 68-76, 2010.
- Belsham DD, Cai F, Cui H, Smukler SR, Salapatek AM, Shkreta L. Generation of a phenotypic array of hypothalamic neuronal cell models to study complex neuroendocrine disorders. *Endocrinology*. 2004 Jan;145(1):393-400.
- Belsham DD, Fick LJ, Dalvi PS, Centeno ML, Chalmers JA, Lee PK, Wang Y, Drucker DJ, Koletar MM. Ciliary neurotrophic factor recruitment of glucagon-like peptide-1 mediates neurogenesis, allowing immortalization of adult murine hypothalamic neurons. *FASEB J*. 2009 Dec;23(12):4256-65.
- Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005;171(4):603–614.
- Bouret SG. *Development of Hypothalamic Circuits That Control Food Intake and Energy Balance. Appetite and Food Intake: Central Control*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2017.
- Brasil. Ministério da Saúde. *Vigitel Brasil 2016 Saúde Suplementar: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde Suplementar. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 157 p.*
- Cai N, Zhao X, Jing Y, Sun K, Jiao S, Chen X, Yang H, Zhou Y, Wei L. Autophagy protects against palmitate-induced apoptosis in hepatocytes. *Cell Biosci*. 2014 May 21;4:28.

Campana M., Bellini L., Rouch C., Rachdi L., Coant N., Butin N., Bandet C.L., Philippe E., Meneyrol K., Kassis N., et al. Inhibition of central de novo ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances β -cell function of obese Zucker rats. *Mol. Metab.* 2018;8:23–36. doi: 10.1016/j.molmet.2017.10.013.

Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell.* 2008 Sep 19;134(6):933-44.

Carta G, Murru E, Banni S, Manca C. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Front Physiol.* 2017 Nov 8;8:902.

Carta G, Murru E, Lisai S, Sirigu A, Piras A, Collu M, Batetta B, Gambelli L, Banni S. Dietary triacylglycerols with palmitic acid in the sn-2 position modulate levels of N-acylethanolamides in rat tissues. *PLoS One.* 2015 Mar 16;10(3):e0120424.

Chan KL, Boroumand P, Milanski M, Pilon NJ, Bilan PJ, Klip A. Deconstructing metabolic inflammation using cellular systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2017 Apr 1;312(4):E339-E347.

Chan KL, Pilon NJ, Sivaloganathan DM, Costford SR, Liu Z, Theret M, Chazaud B, Klip A. Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Biol Chem.* 2015;290:16979–16988.

Chang Y., Juhász G., Goraksha-Hicks P., Arsham A., Mallin D., Muller L., Neufeld T. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 2009;37:232–236.

Cheng XT, Xie YX, Zhou B, Huang N, Farfel-Becker T, Sheng ZH. Revisiting LAMP1 as a marker for degradative autophagy-lysosomal organelles in the nervous system. *Autophagy.* 2018;14(8):1472–1474.

Contreras C, González-García I, Martínez-Sánchez N, et al. Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Rep* 2014;9:366–377.

Cruciani-Guglielmacci C, López M, Campana M, le Stunff H. Brain Ceramide Metabolism in the Control of Energy Balance. *Front Physiol.* 2017;8:787.

Dalvi P. S., Chalmers J. A., Luo V., Han D. Y., Wellhauser L., Liu Y., et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF- α on appetite-regulating NPY neurons. *Int. J. Obes.* 2017; 41 149–158.

Daumerie CM, Woollett LA, Dietschy JM. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(22):10797–10801.

De Duve C., Wattiaux R. Functions of Lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 1966;28:435–492. doi: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251.

Dimopoulos N, Watson M, Sakamoto K, Hundal HS. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J.* 2006 Nov 1;399(3):473-81.

Dong D. Wang, Yanping Li, Stephanie E. Chiuve, Meir J. Stampfer,, JoAnn E. Manson, Eric B. Rimm, Walter C. Willett, and Frank B. Hu, Specific Dietary Fats in Relation to Total and Cause-Specific Mortality. *JAMA Intern Med.* 2016 Aug 1; 176(8): 1134–1145.

Elmqvist J. K., Coppari R., Balthasar N., Ichinose M., Lowell B. B. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J. Comp. Neurol.* 2005; 493 63–71.

Ertunc ME, Hotamisligil GS. Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. *J Lipid Res.* 2016;57(12):2099–2114.

Everitt BJ, Hokfelt T. Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. *Acta Neurochirurgica.* 1990;47:1–15.

Filippov V, Song MA, Zhang K, et al. Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* 2012;29(3):537–547.

Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):337-50.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J).* 2007 Nov;83(5 Suppl):S192-203.

Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell.* 2008 May;19(5):2092-100.

Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32 Suppl 7(Suppl 7):S109–S119.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221(1):3–12.

González-García I, Fernø J, Diéguez C, Nogueiras R, López M. Hypothalamic lipids: key regulators of whole body energy balance. *Neuroendocrinology*. 2017;104(4):398–411.

Guo X., Li H., Xu H., Halim V., Zhang W., Wang H., Ong K.T., Woo S.L., Walzem R.L., Mashek D.G., et al. Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. *PLoS ONE*. 2012;7:e39286.

Hernández-Cáceres MP, Toledo-Valenzuela L, Díaz-Castro F, et al. Palmitic Acid Reduces the Autophagic Flux and Insulin Sensitivity Through the Activation of the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) in the Hypothalamic Neuronal Cell Line N43/5. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Mar 26;10:176.

Hodson L, McQuaid SE, Karpe F, Frayn KN, Fielding BA. Differences in partitioning of meal fatty acids into blood lipid fractions: a comparison of linoleate, oleate, and palmitate. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(1):E64–E71.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – POF. Rio de Janeiro, 2010.

Jaishy B, Abel ED. Lipids, lysosomes, and autophagy. *J Lipid Res*. 2016;57(9):1619–1635.

Ji R, Akashi H, Drosatos K, Liao X, Jiang H, Kennel PJ, Brunjes DL, Castillero E, Zhang X, Deng LY, Homma S, George IJ, Takayama H, Naka Y, Goldberg IJ, Schulze PC. Increased de novo ceramide synthesis and accumulation in failing myocardium. *JCI Insight*. 2017 May 4;2(9):e82922.

Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. 2009;20(7):1992–2003.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science. McGraw-Hill, Health Professions Division, New York, 2000.

Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011;18(4):571–580.

Kaushik S, Rodriguez-Navarro JA, Arias E, Kiffin R, Sahu S, Schwartz GJ, Cuervo AM, Singh R. Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell Metab.* 2011; 14(2):173-83.

Kim KH & Lee MS. Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10(6):322-37.

Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 1):7-18.

Kris-Etherton PM, Yu S. Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(5 Suppl):1628S-1644S.

Kuchitsu Y, Fukuda M. Revisiting Rab7 Functions in Mammalian Autophagy: Rab7 Knockout Studies. *Cells.* 2018 Nov 19;7(11):215.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Ver Immunol.* 2011 Feb;30(1):16-34.

Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005 Apr;48(2):196-206.

Le Thuc O, Stobbe K, Cansell C, Nahon JL, Blondeau N, Rovère C. Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 Aug 14;8:197.

Liu J, Chang F, Li F, Fu H, Wang J, Zhang S, Zhao J, Yin D. Palmitate promotes autophagy and apoptosis through ROS-dependent JNK and p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jul 31;463(3):262-7.

Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C, Liu HF. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation *Cell Mol Biol Lett.* 2016 Dec 13;21:29.

Maffetone PB, Rivera-Dominguez I, Laursen PB. Overfat and Underfat: New Terms and Definitions Long Overdue. *Front Public Health.* 2017 Jan 3; 4:279.

Malhotra R, Warne JP, Salas E, Xu AW, Debnath J. Loss of Atg12, but not Atg5, in proopiomelanocortin neurons exacerbates diet-induced obesity. *Autophagy* 2015; 11:145-54.

Maloney CA, Gosby AK, Phuyal JL, Denyer GS, Bryson JM & Caterson ID. Site-specific changes in the expression of fat-partitioning genes in weanling rats exposed to a lowprotein diet in utero. *Obesity Research*. 2003; 11: 461–468.

Martínez de Morentin PB, Varela L, Fernø J, Nogueiras R, Diéguez C, López M. Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar;1801(3):350-61.

Martinez-Vicente M. Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Apr; 40:115-26.

Mayer CM, Belsham DD. Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*. 2010 Feb;151(2):576-85.

Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith P, Pedula C, Roberts J, Weiner R. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tu- morigenesis. *Neuron*. 1990; 5:1–10.
Mencarelli C, Martinez-Martinez P. Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cellular And Molecular Life Sciences*. 2012;70(2):181-203.

Meng Q, Cai D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the IkappaB kinase beta (IKKbeta)/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem*. 2011. Sep; 16;286(37):32324-32.

Milanski M, Degasperi G, Coope A, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*. 2009;29(2):359–370.

Mizushima N & Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011; 147(4): 728-41.

Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010 Feb 5;140(3):313-26.

Oh TS, Cho H, Cho JH, Yu SW, Kim EK. Hypothalamic AMPK induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. *Autophagy*. 2016 Nov;12(11):2009-2025.

Papáčková Z, Dančková H, Páleníčková E, Kazdová L, Cahová M. Effect of short- and long-term high-fat feeding on autophagy flux and lysosomal activity in rat liver. *Physiol Res* 61, Suppl 2: S67–S76, 2012.

PAXINOS, George; WATSON, Charles. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6. ed. Sydney: Academic Press, 2007. 456 p.

Portovedo M, Ignacio-Souza LM, Bombassaro B, Coope A, Reginato A, Razolli DS, Torsoni MA, Torsoni AS, Leal RF, Velloso LA, Milanski M. Saturated fatty acids modulate autophagy's proteins in the hypothalamus. *PLoS One*. 2015 Mar 18;10(3):e0119850.

Quan W, Kim HK, Moon EY, Kim SS, Choi CS, Komatsu M, et al. Role of hypothalamic proopiomelanocortin neuron autophagy in the control of appetite and leptin response. *Endocrinology* 2012; 153:1817-26.

Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-arencibia M, Green-thompson ZW. Regulation of Mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010;90(1383–1435):1383–1435.

Reginato A, et al. Autophagy proteins are modulated in the liver and hypothalamus of the offspring of mice with diet-induced obesity. *J Nutr Biochem*. 2016;34:30–41.

Schneider JL & Cuervo AM. Liver autophagy: just taking out the trash. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11(3):187-200.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):661-71.

Singh R, Cuervo AM. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int J Cell Biol* 2012;2012:282041.

Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009;458:1131–5.

Singh R. Autophagy and regulation of lipid metabolism. *Results Probl Cell Differ*. 2010;52:35–46.

Souza C.O., Vannice G.K., Neto J.C.R., Calder P.C. Is Palmitoleic Acid a Plausible Nonpharmacological Strategy to Prevent or Control Chronic Metabolic and Inflammatory Disorders? *Mol. Nutr. Food Res*. 2017;62:1700504. doi: 10.1002/mnfr.201700504.

Stefan N, Kantartzis K, Celebi N, et al. Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care*. 2010;33(2):405–407.

Su P, Zhang J, Wang D, Zhao F, Cao Z, Aschner M, Luo W. The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia. *Neuroscience*. 2016 Apr 5;319:155-67.

Thaler JP, Yi CX, Schur EA, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans [published correction appears in *J Clin Invest*. 2012 Feb 1;122(2):778]. *J Clin Invest*. 2012;122(1):153–162.

Tse EK, Belsham DD. Palmitate induces neuroinflammation, ER stress, and *Pomc* mRNA expression in hypothalamic mHypoA-POMC/GFP neurons through novel mechanisms that are prevented by oleate. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2018;472:40-49.

Valdearcos M, Douglass JD, Robblee MM, Dorfman MD, Stifler DR, Bennett ML, Gerritse I, Fasnacht R, Barres BA, Thaler JP, Koliwad SK. Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility. *Cell Metab*. 2017 Jul 5;26(1):185-197.e3.

Velloso, L.A. The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2009. 53 (2);151-8.

Wang, J. & Nie, D. Modulation of Autophagy by Free Fatty Acids. (InTech, 2015).
Xu Y, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejaska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*. 2007;27(1):135–144.

Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, Roberts AJ, Hannun YA, Samad F. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(1):E211–E224.

Yang ZH, Miyahara H, Hatanaka A. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. *Lipids Health Dis*. 2011;10:120.

Ye W, Ramos EH, Wong BC, Belsham DD. Beneficial Effects of Metformin and/or Salicylate on Palmitate- or TNF α -Induced Neuroinflammatory Marker and Neuropeptide Gene Regulation in Immortalized NPY/AgRP Neurons. *PLoS One*. 2016 Nov 28;11(11):e0166973.

Ye W, Ramos EH, Wong BC, Belsham DD. Beneficial Effects of Metformin and/or Salicylate on Palmitate- or TNF α -Induced Neuroinflammatory Marker and Neuropeptide Gene Regulation in Immortalized NPY/AgRP Neurons. *PLoS One*. 2016 Nov 28;11(11):e0166973.

Yordy B, Tal MC, Hayashi K, Arojo O, Iwasaki A. Autophagy and selective deployment of Atg proteins in antiviral defense. *International Immunology*. 2012; 25(1); 1-10.

Zhang L, Wang H. Autophagy in Traumatic Brain Injury: A New Target for Therapeutic Intervention. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:190.