



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas

MARIANA PORTOVEDO DE OLIVEIRA ARAÚJO

**A REGULAÇÃO DA AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS NO
HIPOTÁLAMO EM RESPOSTA AO EXCESSO DE LIPÍDEOS**

**REGULATION OF HYPOTHALAMIC CHAPERONE-MEDIATED AUTOPHAGY IN
RESPONSE TO LIPID OVERLOAD**

LIMEIRA

2018

MARIANA PORTOVEDO DE OLIVEIRA ARAÚJO

**A REGULAÇÃO DA AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS NO
HIPOTÁLAMO EM RESPOSTA AO EXCESSO DE LIPÍDEOS**

**REGULATION OF HYPOTHALAMIC CHAPERONE-MEDIATED AUTOPHAGY IN
RESPONSE TO LIPID OVERLOAD**

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

Thesis presented to the Faculty of Applied Sciences of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Nutrition, Sports and Metabolism Science, in the area of Metabolism and Molecular Biology.

***Orientadora:* Marciane Milanski Ferreira**

***Co-orientadora:* Adriana Souza Torsoni**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA PORTOVEDO DE OLIVEIRA ARAÚJO E ORIENTADA PELA PROF(A). DR(A). MARCIANE MILANSKI FERREIRA

LIMEIRA

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/10911-0

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

Ar15r Portovedo, Mariana, 1987-
A regulação da autofagia mediada por chaperonas no hipotálamo em resposta ao excesso de lipídeos / Mariana Portovedo de Oliveira Araújo. – Limeira, SP : [s.n.], 2018.

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

1. Obesidade. 2. Autofagia. 3. Ácido palmítico. 4. Hipotálamo. 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: Regulation of hypothalamic chaperone-mediated autophagy in response to lipid overload

Palavras-chave em inglês:

Obesity
Autophagy
Palmitic acid
Hypothalamus

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

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

Banca examinadora:

Marciane Milanski Ferreira [Orientador]
Licio Augusto Velloso
Hosana Gomes Rodrigues
Rodrigo Ferreira de Moura
Maria Esmérica Corezola do Amaral

Data de defesa: 18-01-2018

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

18 de Janeiro de 2018

Banca examinadora

Marciane Milanski Ferreira (presidente da banca)

Lício Augusto Velloso

Hosana Gomes Rodrigues

Rodrigo Ferreira de Moura

Maria Esméria Corezola do Amaral

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Ao meu amor, Fernando Martini.
Meu companheiro durante todos estes anos, obrigada por me apoiar
incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente minha mãe Adriana e meus avós, Leonel e Adelaide, por serem os meus maiores apoiadores e por seu amor incondicional.

Ao meu namorado, Fernando Martini, porque sem você nada disso teria razão. Obrigada por tudo!

À minha orientadora Marciane, seu amor pela profissão de nutricionista é um exemplo para mim. Sou eternamente grata por todas as oportunidades e ensinamentos.

À minha co-orientadora Adriana, um exemplo de competência. O mundo acadêmico precisa de mais pessoas como você! Obrigada por tudo que me ensinou.

À Letícia Souza, por ter me ensinado tudo que sei dentro do laboratório. Por ser uma inspiração e por sua amizade.

Às queridas alunas do grupo da Marciane: Josiane e Andressa, por toda a ajuda prestada, pelos conselhos e acima de tudo, pela amizade. Obrigada por me aturarem em todos os momentos!

Aos alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório, em especial à Ana Vieira e Mariana Piton, vocês têm um lugar mais do que especial no meu coração. Obrigada por tudo!

Às minhas amigas de bancada e pra vida inteira: Laís, Marina, Fernanda e Letícia: sem vocês o dia-a-dia não seria o mesmo. Obrigada por cada momento

dividido, pelas risadas e pelos desabafos.

Ao professor Márcio Torsoni, de uma bondade imensa e sem precedentes. Obrigada por dividir um pouco da sua experiência com nós alunos.

Ao REGLYS e toda sua equipe, em especial ao professor Hervé Le Stunff e às alunas Mélanie Campana e Lara Bellini que me acolheram de braços abertos durante minha estadia em seu laboratório.

Aos meus colegas do Labdime, que fazem com que as horas de trabalho se tornem mais prazerosas.

Às minhas eternas amigas Ana Paula Trevizan, Camila Bacan, Michelle Momesso e Laís Amaral.

Agradeço ao Rubens e à Desirée Martini, por me acolherem em sua família.

Aos animais experimentais, que doam suas vidas de forma involuntária à pesquisa.

Aos membros da banca avaliadora.

Finalmente agradeço à FAPESP pelo financiamento à pesquisa.

Obrigada!

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde global e está diretamente associada com o risco de desenvolvimento de outras doenças metabólicas. Um estilo de vida saudável, incluindo uma alimentação equilibrada, é essencial para a manutenção da eutrofia. Os mamíferos possuem um poderoso sistema que é responsável pela regulação da homeostasia energética, sendo que, no hipotálamo estão localizados neurônios relacionados com o acoplamento entre a fome e a saciedade. Estes neurônios são afetados pela ingestão excessiva de lipídeos, especialmente por ácidos graxos saturados de cadeia longa, e pela obesidade. Sabe-se que a obesidade é marcada pela presença de uma inflamação subclínica e alteração em diversas vias relacionadas ao estresse celular. Em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, há falha na regulação da autofagia e do sistema ubiquitina-proteasoma em neurônios do hipotálamo, que são mecanismos responsáveis pela proteostasia celular. Este trabalho teve como objetivo investigar a modulação de autofagia mediada por chaperonas em neurônios hipotalâmicos de animais obesos. Esse tipo de autofagia é responsável por degradar proteínas citosólicas que contém um motivo específico de aminoácidos, por meio da atuação principal de duas proteínas, denominadas de HSC-70 e LAMP-2A. Nossos resultados mostraram que animais que consumiram dieta hiperlipídica por 3 dias apresentaram maior ativação de autofagia mediada por chaperonas em hipotálamo. Após este período, houve menor ativação de autofagia mediada por chaperonas nesta região. Além disso, neurônios hipotalâmicos expostos ao palmitato, um ácido graxo saturado, apresentaram ativação de autofagia mediada por chaperonas. A exposição destes neurônios hipotalâmicos a um ambiente inflamatório também levou à ativação de autofagia mediada por chaperonas nessas células. Em situações de estresse celular, a ativação da autofagia mediada por chaperonas é essencial para a manutenção da proteostasia. Em contrapartida, a diminuição neste sistema leva a maior susceptibilidade celular a estímulos estressores. Portanto, o excesso de ácidos graxos saturados afeta a autofagia mediada por chaperonas em neurônios do hipotálamo, fato que pode contribuir para a disfunção neuronal e formação de agregados proteicos. A manutenção dos níveis basais de autofagia por meio de intervenções farmacológicas ou dietéticas pode representar uma terapia importante

no tratamento de doenças metabólicas.

Palavras chave: obesidade, autofagia, CMA, ácido palmítico, hipotálamo

ABSTRACT

Obesity has become a global health issue and is directly related with increased risk of developing other metabolic diseases. A healthy lifestyle, including a balanced diet, is essential for the maintenance of a healthy body mass. Mammals have a powerful system responsible for the regulation of energy homeostasis. Neurons from hypothalamus are responsible for the coupling between food intake and satiety. These neurons are affected by lipid excess, especially long-chain saturated fatty acids and obesity. A subclinical inflammatory state is the hallmark of obesity. Also, obesity leads to the dysregulation in several systems related to stress response. In mice with diet-induced obesity, there is a failure in the regulation of macroautophagy and ubiquitin- proteasome system in hypothalamic neurons. These systems are responsible for the cytosolic protein renewal and therefore for cellular proteostasis. This work aimed to study the chaperone-mediated autophagy modulation in obese mice. This type of autophagy is responsible for the degradation of proteins which have a specific amino acid motif. There are two main proteins responsible for chaperone-mediated autophagy machinery, called HSC-70 and LAMP-A. Our results showed an upregulation in chaperone-mediated autophagy in hypothalamus of mice fed a high-fat diet for 3 days. Longer exposure to high-fat diet led to downregulation in hypothalamic chaperone-mediated autophagy. Furthermore, direct exposure of hypothalamic neurons to palmitate, a saturated fatty acid, led to chaperone-mediated autophagy activation. After an insult, the activation of chaperone mediated autophagy is essential for proteostasis maintenance. On the other hand, failure in this system could lead to increased cellular susceptibility to stressors. Thus, saturated fatty acid excess affects neuronal chaperone-mediated autophagy and this could contribute to neuronal dysfunction and protein aggregate formation in hypothalamic neurons. Therefore, the maintenance of basal chaperone-mediated autophagy levels with pharmacology or dietary interventions could represent an important therapy in the treatment of metabolic disorders.

Key words: obesity, autophagy, palmitic acid, hypothalamus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	O sistema da melanocortina no hipotálamo	20
Figura 2	A autofagia mediada por chaperonas	26
Figura 3	Parâmetros metabólicos em camundongos alimentados com dieta CT ou HL por diferentes períodos experimentais	38
Figura 4	A autofagia mediada por chaperonas após o consumo de dieta hiperlipídica por diferentes períodos	40
Figura 5	O perfil na expressão de genes relacionados à inflamação e à autofagia em hipotálamo	42
Figura 6	O tratamento intracerebroventricular com palmitato modula o conteúdo de HSC-70 no hipotálamo	44
Figura 7	A exposição ao palmitato leva à ativação de CMA em neurônios do hipotálamo	46
Figura 8	A exposição à citocinas modula a ativação de CMA em neurônios do hipotálamo	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das dietas experimentais	31
-----------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP	Proteína relacionada ao Agouti
Akt	Proteína quinase B
CMA	<i>Chaperone-mediated autophagy</i>
EF1 α	Fator de elongação 1- α
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GHSR	Receptor secretagogo do hormônio de crescimento
HCS	<i>High Content Screening</i>
HSC-70	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>
HSP-70	<i>70-kilodalton heat shock protein</i>
IKK	Proteína quinase do inibidor do NF- κ B
IL1- β	Interleucina-1 β
IR	Receptor de insulina
I κ B α	Inibidor alfa de NF κ B
JNK	c-Jun N-terminal cinase
LAMP-2A	Proteína associada à membrana no lisossomo 2A
MC3R	Receptor 3 da melanocortina
MC4R	Receptor 4 da melanocortina
MEF2D	<i>Myocyte enhancer factor 2D</i>
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NPY	Neuropeptídeo Y
ObR	Receptor de leptina
PCR	Proteína C reativa
PHLPP1	<i>PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1</i>

POMC	Proopiomelanocortina
PPA	Proteína precursora de amiloide
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
SNC	Sistema nervoso central
TLR4	<i>Toll Like Receptors 4</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TORC2	Proteína alvo da rapamicina 2
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
α -MSH	Hormônio estimulador dos melanócitos α

SUMÁRIO

1.	Introdução	17
1.1	O panorama da obesidade.....	17
1.2	O consumo alimentar e a obesidade	18
1.3	A homeostasia energética	18
1.4	O consumo de dieta hiperlipídica e a inflamação	21
1.5	Os sistemas de degradação e o metabolismo celular	23
1.6	Autofagia mediada por chaperonas: regulação e mecanismos	24
1.7	CMA e sua importância para o sistema nervoso central	28
2.	Objetivo geral	31
2.1	Objetivos específicos	31
3.	Material e Métodos	32
3.1	Animais experimentais	32
3.2	Dissecção do hipotálamo e extração de proteínas.	33
3.3	Imunoprecipitado.....	33
3.4	Western Blot	33
3.5	Extração de RNA e qRT-PCR.....	34
3.6	Tratamento intracerebroventricular (icv)	34
3.7	Cultura de células.....	34
3.8	Extração de lipídeos e dosagem de ceramidas.....	35
3.9	High Content Screening (HCS).....	35
3.10	Análise dos resultados	36
4.	Resultados e discussão	37
4.1	O consumo de dieta hiperlipídica leva a distúrbios metabólicos.....	37
4.2	O consumo de dieta HL leva à alterações na maquinaria da CMA no	

hipotálamo	38
4.3 Expressão de citocinas no hipotálamo de camundongos obesos	41
4.4 O tratamento icv com palmitato altera o conteúdo de proteínas envolvidas na CMA no hipotálamo.....	42
4.5 O tratamento com palmitato leva à ativação de CMA em neurônios do hipotálamo	45
4.6 Citocinas e a ativação de CMA em neurônios do hipotálamo	47
5. Conclusão	50
6. Referências	51
Anexo A - Parecer do comitê de ética em pesquisa	64
Anexo B - Co-autoria de artigos durante o período de doutorado	65
Anexo C – Prêmio	67
Anexo D – Financiamento.....	68

1. Introdução

1.1 O panorama da obesidade

A obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo e está associada com o risco de desenvolvimento de diversas doenças, como doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, osteoartrite, diabetes e câncer de mama, ovário, próstata, fígado, rim e cólon (WHO, 2017).

No mundo a obesidade triplicou desde 1975, sendo que em 2016 cerca de 1,9 bilhão de adultos apresentavam sobrepeso e 650 milhões, obesidade (WHO, 2017). No Brasil mais da metade da população apresenta-se acima do peso e 18,9% dos indivíduos estão obesos. Em dez anos, houve um aumento de 60% nos casos de obesidade no país (BRASIL, 2017). Esses dados são alarmantes, visto o impacto negativo que essa doença possui na qualidade de vida dos indivíduos.

Além disso, a obesidade consome uma larga fatia de custos dos sistemas de saúde nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento. Esse impacto econômico afeta também os gastos privados da sociedade como um todo (TREMMELE et al., 2017). Os custos diretos para o sistema público de saúde do Brasil com as doenças crônicas não transmissíveis giram em torno de 7,5 bilhões de reais por ano, representando 69% do total de gastos ambulatoriais e hospitalares (BRASIL, 2005). Projeções estimam que esses custos podem dobrar até 2050 (RTVELADZE et al., 2013).

O processo de transição nutricional está intimamente conectado ao aumento da prevalência de obesidade no Brasil e no mundo. A transição nutricional se refere à alteração no padrão de consumo alimentar e composição corporal da população, que acompanha as mudanças econômicas e sociais de seu país. Tal fato está associado ao aumento no consumo de alimentos com alta densidade energética e ricos em lipídeos, e também com o aumento da inatividade física (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003; PINHEIRO; FREITAS; CORSO, 2004; COUTINHO; GENTIL; TORAL, 2008; WANDERLEY; FERREIRA, 2010).

1.2 O consumo alimentar e a obesidade

Dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009) relacionados ao consumo alimentar da população brasileira apontam que existe um consumo inadequado de frutas e verduras e um alto consumo de bebidas açucaradas, principalmente pelos adolescentes da população brasileira. Um dado alarmante mostra que 61% da população consome uma quantidade excessiva de açúcar e 82% ultrapassa a recomendação de ingestão de gordura saturada (BRASIL, 2010).

Uma meta-análise mostrou que a diminuição do consumo de lipídeos está associada à redução no peso corporal e na circunferência de quadril. Além disso, a adequada ingestão de lipídeos, entre 25% a 30% do valor energético total, é um fator determinante para a manutenção do peso corporal saudável (HOOPER et al., 2012). Adicionalmente, uma revisão sistemática de 57 estudos de coorte encontrou que o aumento de peso está diretamente e proporcionalmente relacionado ao aumento de taxas de mortalidade (PROSPECTIVE STUDIES COLLABORATION et al., 2009).

Recentemente, em um estudo de coorte, foi demonstrado que o tipo de lipídeo ingerido exerce influência sobre o risco de mortalidade total e por causa específica e reforçou o papel benéfico do consumo de lipídeos insaturados em detrimento do consumo de ácidos graxos saturados e *trans* (WANG et al., 2016).

1.3 A homeostasia energética

A manutenção do peso corporal é regulada por um poderoso sistema que tem como objetivo promover a estabilidade do peso frente a oscilações na ingestão calórica ou no gasto energético. A este processo damos o nome de homeostasia energética (ROSENBAUM; LEIBEL, 2014; KRASHES; LOWELL; GARFIELD, 2016).

O sistema nervoso central (SNC) é responsável por coordenar estímulos de fome e saciedade em resposta à sinais provenientes da periferia, sendo que no hipotálamo estão localizados neurônios de primeira ordem que respondem rapidamente à oscilações metabólicas (KRASHES; LOWELL; GARFIELD, 2016).

O sistema da melanocortina compreende circuitos de neurônios com origem no núcleo arqueado do hipotálamo que expressam a proteína relacionada

ao Agouti (AgRP) e o neuropeptídeo Y (NPY) ou neurônios que expressam proopiomelanocortina (POMC); neurônios POMC do núcleo do trato solitário (NTS) e os alvos destes neurônios que expressam os receptores de melanocortina tipo 3 e 4 (MC3R e MC4R, respectivamente). Os peptídeos da melanocortina agem como agonistas de MC3R e MC4R no SNC e, de forma contrária, AgRP age como um potente antagonista destes receptores. Ademais, as fibras de neurônios POMC se projetam para demais regiões do SNC e do hipotálamo, como por exemplo para o núcleo paraventricular (PVN). Neurônios produtores de AgRP e NPY apresentam projeções para PVN, hipotálamo dorsomedial (DMH) e hipotálamo lateral (LH), no entanto as fibras de neurônios POMC abrangem uma região mais ampla do SNC (CONE, 2005).

O núcleo arqueado do hipotálamo está situado numa região privilegiada do SNC: entre o terceiro ventrículo e a eminência média, próximo do sistema vascular e portanto, de fatores endócrinos presentes no sangue e no líquido cefalorraquidiano (CONE, 2005). Recentemente foi demonstrado que alguns neurônios AgRP se situam fora da barreira hematoencefálica e, com isso, são capazes de responder mais rápido a sinais metabólicos provenientes do plasma (OLOFSSON et al., 2013; YULYANINGSIH et al., 2017).

Ambas populações de neurônios do núcleo arqueado, NPY/AgRP e POMC, expressam receptor de insulina (IR) e de leptina (ObR) (NISWENDER; BASKIN; SCHWARTZ, 2004; CONE, 2005). A insulina, hormônio produzido pelas células β -pancreáticas, e a leptina, produzida pelo tecido adiposo branco, agem como sinais adipostáticos no SNC, circulando no sangue em quantidades proporcionais a massa de tecido adiposo. Em neurônios NPY/AgRP, o aumento dos níveis de insulina e leptina levam à hiperpolarização e diminuição na taxa de disparo neuronal desta população de neurônios e consequentemente, redução da ingestão alimentar. De forma oposta, quando os níveis de insulina e leptina estão elevados, neurônios POMC são ativados e há liberação do hormônio estimulador dos melanócitos α (α -MSH). Então o α -MSH se liga à receptores MC3R e MC4R em neurônios de segunda ordem e há diminuição da ingestão alimentar (NISWENDER; BASKIN; SCHWARTZ, 2004; KRASHES; LOWELL; GARFIELD, 2016).

Outros hormônios e nutrientes também exercem efeitos no sistema da

melanocortina. Por exemplo, a grelina, um peptídeo produzido principalmente por células do estômago, tem sua liberação inibida pela presença de nutrientes e um potente efeito no apetite. No SNC, a grelina se liga ao receptor secretagogo do hormônio de crescimento (GHSR) em neurônios NPY/AgRP, levando a ativação destes neurônios, liberação de GABA e inibição de neurônios POMC e consequentemente, aumento da ingestão alimentar (CONE, 2005).

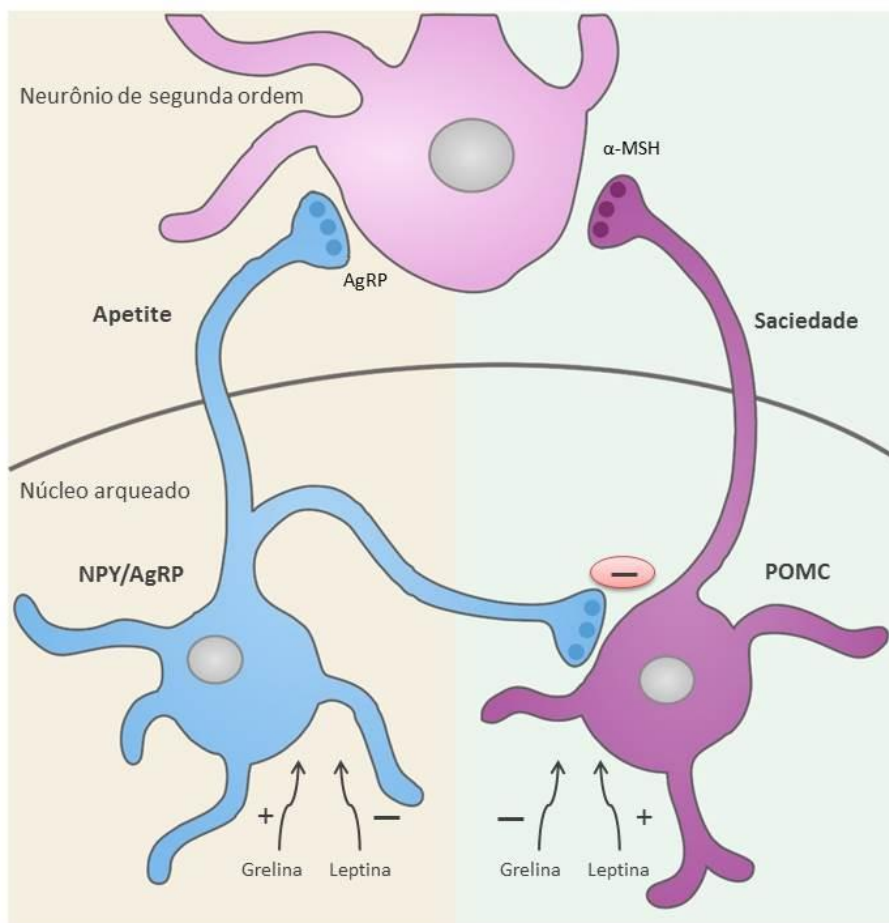


Figura 1. O sistema da melanocortina no núcleo arqueado do hipotálamo. Os neurônios de ordem primária, presentes no núcleo arqueado do hipotálamo, compreendem neurônios produtores de NPY/AgRP, com efeitos orexígenos e neurônios POMC, com efeitos anorexígenos. Estes neurônios possuem projeções para demais núcleos do hipotálamo, como o hipotálamo lateral que contém neurônios orexígenos e o núcleo paraventricular com neurônios anorexígenos. Neurônios NPY/AgRP e POMC expressam receptores como ObR e GHSR. Em neurônios NPY/AgRP, um estado de jejum leva à ativação destes neurônios, pelo aumento de hormônios como a grelina. Quando ativados, NPY/AgRP antagonizam neurônios POMC e levam a ativação de neurônios de segunda ordem, presentes no hipotálamo lateral, responsáveis pelos estímulos de ingestão alimentar. De forma contrária, hormônios como a leptina ativam neurônios POMC, há então liberação de α -MSH que, em neurônios de segunda ordem do hipotálamo paraventricular, se liga

a MC4R e leva a diminuição da ingestão alimentar.

1.4 O consumo de dieta hiperlipídica e a inflamação

Sabe-se que a obesidade e o consumo de dieta hiperlipídica estão relacionados a um processo inflamatório crônico de baixo grau, que por sua vez é responsável pela ativação de diversos mecanismos envolvidos na patogênese da obesidade.

Em 1993 foi demonstrado pela primeira vez que existe aumento na produção de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), uma citocina proinflamatória, em tecido adiposo de camundongos com obesidade induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica (HOTAMISLIGIL et al., 1993). No hipotálamo de camundongos obesos também há aumento de citocinas proinflamatórias, como TNF- α e Interleucina-1 β (IL1- β) (DE SOUZA et al., 2005). A presença aumentada destas citocinas no hipotálamo ocorre um dia após o consumo de dieta hiperlipídica (THALER et al., 2012).

O aumento destas citocinas proinflamatórias leva à resistência à sinalização da leptina e insulina no hipotálamo e em outros tecidos (HOTAMISLIGIL et al., 1996; DE SOUZA et al., 2005; MILANSKI et al., 2009; MUNZBERG et al., 2004). Esse mecanismo envolve a ativação de quinase c-Jun N-terminal (JNK) e da proteína quinase do inibidor do NF- κ B (IKK), que agem fosforilando em serina proteínas da via de sinalização de insulina. Essa fosforilação consiste em uma fosforilação inibitória, que leva à resistência hipotalâmica a estes hormônios e consequente perda do controle da fome (DE SOUZA et al., 2005; ZHANG et al., 2008; BENZLER et al., 2015).

Alguns mecanismos estão associados à ativação de vias inflamatórias em modelos de obesidade, como por exemplo ativação de *toll like receptor 4* (TLR4), aumento na produção de ceramidas, presença de estresse de retículo endoplasmático (RE), entre outros.

Os TLR4 são componentes do sistema imune inato e parte da família dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), responsivos a padrões moleculares associados a patógenos. Estes receptores em especial reconhecem lipopolissacarídeos presentes na parede celular de bactérias gram-negativas (YI XU

et al., 2007; AKIRA e TAKEDA, 2004). Quando ativados, os TLR4 iniciam uma cascata de sinalização que culmina na ativação de IKK e produção de citocinas inflamatórias (AKIRA e TAKEDA, 2004). Além disso, o TLR4 é ativado em resposta ao excesso de ácidos graxos saturados, fato que contribui para a resposta inflamatória e resistência à insulina e leptina no hipotálamo (MILANSKI et al., 2009).

Em neurônios hipotalâmicos a exposição ao palmitato leva ao aumento na síntese *de novo* de ceramidas e resistência à insulina (CAMPANA et al., 2017). As ceramidas são lipídeos bioativos produzidos majoritariamente a partir de ácidos graxos saturados como o palmitato. Na obesidade, o excesso de ceramidas é um importante fator relacionado ao estado de lipotoxicidade (CRUCIANI-GUGLIELMACCI et al., 2017).

A obesidade está relacionada também com a presença de estresse de RE em neurônios hipotalâmicos que, por sua vez, leva à ativação da via de NF- κ B (ZHANG et al., 2008). Além disso, o estresse de RE leva ao comprometimento no processamento de POMC/ α -MSH e perda do controle de ingestão alimentar (CAKIR et al., 2013).

O RE é uma organela com função na síntese e enovelamento de proteínas, biossíntese de lipídeos e armazenamento de cálcio. Alterações no microambiente do RE podem levar ao acúmulo de proteínas mal formadas, a principal marca do estresse de RE. Tal evento inicia a ativação de uma resposta adaptativa chamada de *Unfolded Protein Response* (UPR) (SZEGEZDI et al., 2009; MANDL et al., 2009; HOTAMISLIGIL, 2006). A UPR tem como alvo o aumento da capacidade do RE de enovelar proteínas e assim, o retorno da homeostasia do RE. De forma importante, as vias de ativação de UPR levam à indução de inflamação e, consequentemente, resistência à insulina. Ainda, dependendo do grau e cronicidade de estresse de RE, a morte celular por apoptose pode ser ativada (SZEGEZDI et al., 2009; MANDL et al., 2009).

Em humanos com obesidade a inflamação crônica de baixo grau também está presente (ZICCARDI et al., 2002; VAN DE SANDE-LEE et al., 2011). Por meio de ressonância magnética, demonstrou-se que há presença de gliose na região do hipotálamo mediobasal em humanos obesos (THALER et al., 2011). Além disso,

indivíduos obesos apresentam uma alteração funcional em regiões do SNC relacionadas à ingestão alimentar, sendo que a perda de peso acentuada leva ao aumento na concentração de IL-10 em líquido cefalorraquidiano e reversão parcial da disfunção hipotalâmica (VAN DE SANDE-LEE et al., 2011). Perda de peso associada a mudanças de hábitos alimentares e prática de atividade física está, ainda, relacionada à diminuição na concentração sérica de marcadores inflamatórios, como por exemplo IL-6, IL-18 e proteína C reativa (PCR), em mulheres obesas (ESPOSITO et al., 2002, 2003).

Portanto, estudos em modelos experimentais e humanos demonstram que a obesidade está associada ao dano neuronal em uma área do SNC essencial para o controle do peso corporal que é o hipotálamo.

1.5 Os sistemas de degradação e o metabolismo celular

Trabalhos recentes demonstraram que os sistemas de degradação intracelulares estão envolvidos na gênese da obesidade, conforme o revisado por Cavadas e colaboradores (2010). O sistema ubiquitina-proteassoma e a autofagia são os maiores reguladores do controle de qualidade proteica da célula e, portanto, são os principais responsáveis pela homeostasia intracelular. Frente a estímulos estressores e diversas doenças, esses sistemas atuam protegendo a célula por meio da manutenção de sua proteostasia, *i.e.* homeostasia proteica (JACKSON; HEWITT, 2016; DIKIC, 2017).

O sistema ubiquitina proteassoma (UPS) atua por meio de proteínas denominadas ubiquitinas que, por meio de ligações covalentes se ligam às proteínas alvo. A adição de cadeias de ubiquitina, *i.e.* poliubiquitinação, é um sinal para que a proteína-alvo seja degradada pelo proteassoma (ORENSTEIN; CUERVOA, 2010; WEISSMAN; SHABEK; CIECHANOVER, 2011).

O UPS é responsável pela degradação de inúmeras proteínas, que por sua vez controlam os mais variados processos intracelulares. Ignácio-Souza e colaboradores (2014) demonstraram que a exposição crônica à dieta hiperlipídica leva a falha no UPS e acúmulo de proteínas ubiquitinadas em hipotálamo de animais obesos.

Outro mecanismo de degradação de conteúdos intracelulares é a autofagia. O termo autofagia refere-se ao processo de degradação de material citoplasmático por meio dos lisossomos (KAUSHIK et al., 2011; GALLUZZI et al., 2017). Os alvos de degradação podem ser endógenos, *e.g.* mitocôndrias, ou exógenos, *e.g.* patógenos. Outro aspecto importante da autofagia é o fato de que ela pode atuar de forma não seletiva, em um estado de jejum, ou de forma seletiva, degradando organelas danificadas e até mesmo patógenos intracelulares, conferindo a este processo um importante papel no controle homeostático da célula (LEVINE; KLIONSKY, 2017).

A autofagia atua na célula por meio de diferentes mecanismos, podendo portanto ser dividida em três tipos: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (CMA). Na microautofagia a superfície do lisossomo sofre uma invaginação e captura o material do citosol a ser degradado. Na macroautofagia, frequentemente chamada de autofagia apenas, é formada uma vesícula de dupla-membrana, denominada autofagossomo, que se funde ao lisossomo, formando o autofagolisossomo. No autofagolisossomo proteínas, organelas e lipídeos são degradados pelas enzimas lisossomais. Já na CMA, uma chaperona citosólica encaminha proteínas específicas para a proteína associada à membrana no lisossomo 2A (LAMP-2A), que transloca o material para o interior do lisossomo onde ocorre a degradação proteica (PARZYCH; KLIONSKY, 2014; JACKSON; HEWITT, 2016; RAVANAN; SRIKUMAR; TALWAR, 2017).

Dados recentes mostraram que a autofagia está diminuída em camundongos obesos. Além disso, o tratamento intracerebroventricular com rapamicina, um indutor de autofagia, leva à diminuição de marcadores de inflamação, estresse de retículo endoplasmático e apoptose nestes animais (PORTOVEDO et al., 2015). Ademais, a manutenção das taxas basais de autofagia em neurônios hipotalâmicos é essencial para a manutenção da funcionalidade destas células (COUPÉ et al., 2012; KAUSHIK et al., 2011, QUAN et al., 2012; MENG e CAI, 2011).

1.6 Autofagia mediada por chaperonas: regulação e mecanismos

O conceito de degradação lisossomal seletiva foi publicado pela primeira

vez em 1989, após a identificação de uma proteína de 73 kDa, pertencente a família das *70-kilodalton heat shock proteins* (HSP-70), como sendo responsável por se ligar às regiões peptídicas e marcar proteínas intracelulares para a degradação lisossomal em resposta à deprivação de nutrientes (CHIANG et al., 1989). Pouco tempo depois, identificou-se a sequência de peptídeos necessária para que proteínas do citosol fossem degradadas pelo lisossomo (DICE, 1990).

Na CMA todas as proteínas alvo contêm um motivo de pentapeptídeos, denominado KFERQ, necessário para que a proteína *heat shock cognate 71 kDa protein* (HSC-70), identificada no trabalho de 1989, as reconheça. Esse motivo depende das características físicas dos aminoácidos e não de sua sequência. O KFERQ é determinado, portanto pela presença de resíduos carregados positivamente, negativamente, hidrofóbicos e um quarto aminoácido com resíduo carregado positivamente ou hidrofóbico, sempre flanqueados por uma glutamina em algum dos lados (KAUSHIK, S.; CUERVO, 2013).

A degradação das proteínas alvo é regulada por meio da acessibilidade do KFERQ na proteína. Este motivo pode ficar acessível após o desdobramento parcial da proteína, desligamento de complexos ou até mesmo modificações pós-traducionais (KAUSHIK, S.; CUERVO, 2013).

Após o reconhecimento da proteína pela HSC-70, ocorre o encaminhamento do complexo para a proteína LAMP-2A. Um fato importante é que a quantidade de LAMP-2A na membrana lisossomal é limitante para a modulação dos níveis de CMA na célula (KAUSHIK et al., 2011; KAUSHIK, S.; CUERVO, 2013). Nesse contexto, alterações na transcrição, na sua degradação pelo próprio lisossomo e na subcompartimentalização desta proteína são os mecanismos responsáveis pelas oscilações no conteúdo de LAMP-2A na membrana do lisossomo (KAUSHIK, S.; CUERVO, 2013).

A ligação do substrato acontece na cauda citosólica da LAMP-2A, ocorrendo então a formação de um complexo multimérico desta proteína, necessário para translocação da proteína-alvo para o interior do lisossomo. Além do mais, a proteína substrato é desdobrada antes de se translocar para o interior da organela. Após, com o auxílio da HSC-70, a proteína LAMP-2A volta à sua forma monomérica.

É então que a proteína-alvo sofre a lise pelas enzimas lisossomais (KAUSHIK et al., 2011).

Outras proteínas também auxiliam na maquinaria da CMA. A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em sua forma não fosforilada é capaz de se ligar e promover a estabilização do complexo de LAMP-2A durante o processo de translocação. Já em sua forma fosforilada, GFAP se associa ao fator de elongação 1- α (EF1 α) na membrana do lisossomo. Na presença de GTP, EF1 α se desliga da membrana, GFAP deixa o complexo de translocação e se associa com GFAP fosforilado. Tal fato resulta na desmontagem do complexo de LAMP-2A e diminuição de CMA. Além disso, a chaperona HSP-90 na face luminal do lisossomo auxilia na estabilização do complexo de LAMP-2A durante o processo de translocação (KAUSHIK et al., 2011; KAUSHIK, S.; CUERVO, 2013; TASSET; CUERVO, 2016).

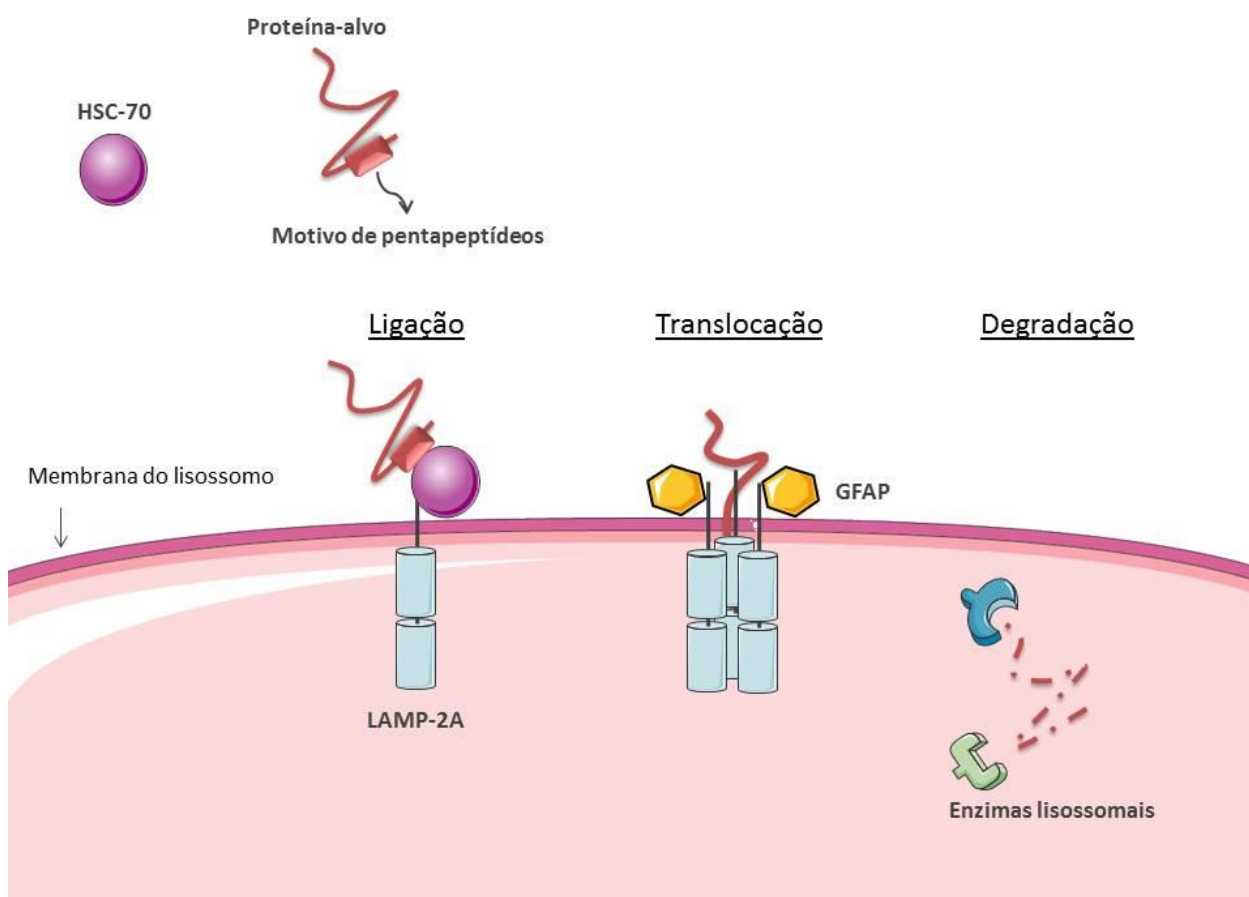


Figura 2. A autofagia mediada por chaperonas. A chaperona HSC-70 reconhece proteínas alvo, que contém o motivo de pentapeptídeos denominado KFERQ. Após, HSC-70 encaminha a proteína para a proteína da membrana do lisossomo, LAMP-2A, que forma um complexo multimérico com o auxílio de GFAP. Há translocação da

proteína-alvo para o interior do lisossomo e sua degradação pelas enzimas lisossomais.

Os mecanismos que regulam a ativação da CMA ainda são pouco conhecidos. No entanto, sabe-se que este processo é regulado de forma positiva pela desfosforilação da proteína quinase B (Akt) pela *PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1* (PHLPP1) na membrana lisossomal. De forma oposta, a proteína alvo da rapamicina 2 (TORC2) promove ativação de Akt e aumento da razão de pGFAP na membrana do lisossomo. Isso leva à diminuição de GFAP no complexo de LAMP-2A, gerando instabilidade na formação do complexo e consequente diminuição de CMA nas células (ARIAS et al., 2015).

Além das funções primordiais do processo de autofagia em manter o controle da qualidade proteica da célula e fornecer aminoácidos e energia em condições de jejum, a CMA também atua em funções específicas, a depender da proteína-alvo a ser degradada. Por exemplo, a CMA tem como alvo alguns fatores de transcrição e inibidores de fatores de transcrição, regulando dessa forma os níveis de transcrição de seus genes alvo (ORENSTEIN; CUERVO, 2010; KAUSHIK, S.; CUERVO, 2013).

Um exemplo da seletividade da CMA é a degradação do inibidor alfa de NFκB (IκBα) em resposta ao jejum prolongado. Essa degradação culmina na ativação de NFκB e de seu programa transcricional, que é necessário para a adaptação ao jejum (CUERVO et al., 1998). Outro exemplo importante é a degradação pela CMA de reguladores negativos da ativação de linfócitos T. A deleção de LAMP-2A neste tipo celular leva a uma resposta inadequada à infecção (VALDOR et al., 2014).

A diminuição da CMA está relacionada à maior susceptibilidade das células a agentes estressores pelo aumento de proteínas oxidadas e danificadas no citoplasma e consequente, aumento de apoptose celular (MASSEY et al., 2006). Ademais, existe um declínio nos níveis de CMA no fígado com o envelhecimento, que leva ao aumento da susceptibilidade ao estresse oxidativo e disfunção hepática em camundongos (SCHNEIDER et al., 2015). Ainda, a manutenção dos níveis de CMA durante o envelhecimento, por meio de manipulação genética, associa-se ao menor acúmulo de proteínas danificadas e melhora na função hepática (ZHANG;

CUERVO, 2008).

1.7 CMA e sua importância para o sistema nervoso central

Em neurônios, a diminuição nos sistemas de controle de qualidade proteica é especialmente prejudicial. Isso porque essas células apresentam baixas taxas de divisão e um citoplasma amplo (KOGA; CUERVO, 2011), fato que pode favorecer o aparecimento de agregados proteicos.

Assim, o acúmulo de proteínas danificadas e/ou mal dobradas está diretamente associado à patogênese de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington (CIECHANOVER; KWON, 2017). A CMA está envolvida na degradação de proteínas mutadas relacionadas a estas doenças, como a α -sinucleína e a proteína tau, que por sua vez parecem contribuir de forma negativa na CMA. A falha neste tipo de autofagia parece ser uma particularidade das doenças neurodegenerativas (CUERVO et al., 2004; VOGIATZI et al., 2008; XILOURI et al., 2009; KOGA; CUERVO, 2011).

Ainda no contexto das doenças neurodegenerativas, a doença de Alzheimer acomete uma parcela significativa dos indivíduos com mais de 65 anos. Os achados comuns à esta doença envolvem a formação de placas de β -amiloide extracelulares, que contém agregados proteicos de proteína precursora de amiloide (PPA) e emaranhados neurofibrilares, gerados pela hiperfosforilação de proteína tau, entre outros (GLASS et al., 2010). Ademais, concentrações elevadas de citocinas inflamatórias estão presentes no cérebro *post mortem* de indivíduos acometidos com Alzheimer (SUDDUTH et al., 2013).

De forma interessante, um estudo realizou *microarray* de genes envolvidos em vias inflamatórias em cérebro *post mortem* de adultos ou idosos acometidos ou não com a doença de Alzheimer e mostrou que envelhecimento *per se* está relacionado com mudanças significativas na expressão de genes envolvidos com o sistema imune e inflamação (CRIBBS et al., 2012). Este trabalho reforça o conceito no qual o envelhecimento leva ao aumento generalizado de inflamação no SNC, que é afetado ainda mais durante a patogênese da doença de Alzheimer. Reforçando o papel da inflamação na gênese de doenças neurodegenerativas, um estudo de coorte mostrou que o aumento nas concentrações séricas de fatores

inflamatórios tem correlação positiva com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (ENGELHART et al., 2004). Ademais, em um modelo transgênico de doença de Alzheimer, o aumento na produção de citocinas inflamatórias parece preceder a formação de placas de β -amiloide extracelulares (HANZEL et al., 2014).

Portanto, embora a patogênese das doenças neurodegenerativas seja complexa e diversificada, é consenso na literatura que a inflamação de baixo grau exerce um papel central no desenvolvimento e progressão da neurodegeneração, conforme o revisado por Glass e colaboradores (2010). Além da correlação positiva entre o processo de envelhecimento e a produção aumentada de citocinas inflamatórias, um importante trabalho demonstrou que o controle transcricional da autofagia está diminuído no SNC de humanos com o envelhecimento (LIPINSKI et al., 2010), fato que sugere que a regulação neste sistema de degradação proteica no SNC com o envelhecimento pode estar alterada e, portanto, pode contribuir para o acúmulo de proteínas disfuncionais nesse contexto.

Por sua vez, o acúmulo de proteínas mal dobradas é o passo inicial necessário para a formação de agregados proteicos. Portanto, o declínio na atividade dos sistemas de degradação proteica, associado ao dano na estrutura de proteínas, causado, por exemplo, pela presença de estresse oxidativo, leva à insolubilidade destas proteínas e consequente formação de agregados proteicos. Vale ressaltar que grande parte das doenças neurodegenerativas está associada à formação de agregados proteicos. Em suma, estes achados reforçam o papel central da perda da proteostasia celular na neurodegeneração associada ao envelhecimento.

Uma função recém-descoberta da CMA em neurônios é seu papel na degradação do fator de transcrição denominado *myocyte enhancer factor 2D* (MEF2D). Níveis diminuídos de CMA levam ao acúmulo desta proteína no citoplasma, que deixa de exercer sua função no controle transcricional e leva à morte por apoptose de neurônios (YANG et al., 2009; GAO et al., 2014).

De forma geral, sabe-se que os neurônios hipotalâmicos são afetados pela obesidade e pelo excesso de ácidos graxos saturados de tal forma que há

presença de agregados proteicos e estresse de retículo endoplasmático nestas células. Nesse contexto, a autofagia exerce um importante papel na manutenção da viabilidade celular frente à estímulos estressores. Portanto, estudar os efeitos da obesidade na CMA em neurônios hipotalâmicos se faz importante, visto que em outras doenças de cunho neurodegenerativo a manutenção dos níveis deste tipo de autofagia exerce um importante efeito protetor.

2. Objetivo geral

Avaliar a autofagia mediada por chaperonas no hipotálamo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e em neurônios hipotalâmicos expostos ao palmitato, bem como investigar o papel das células da micróglia nesta relação.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a autofagia mediada por chaperonas no hipotálamo de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica por 3 dias, 1, 4 ou 8 semanas;
- Investigar a modulação da autofagia mediada por chaperonas em resposta ao palmitato e à condições inflamatórias em neurônios hipotalâmicos;
- Analisar o papel de células da micróglia expostas ao palmitato na atividade de autofagia mediada por chaperonas em neurônios do hipotálamo.

3. Material e Métodos

3.1 Animais experimentais

Os procedimentos foram seguidos de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram certificados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA 4245-1). Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss*, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os camundongos foram recebidos com 4 semanas de idade e ficaram em período de aclimatação por mais 3 semanas até atingir a idade adulta. Então, com sete semanas de idade, foram divididos aleatoriamente em dois grupos, um grupo controle (CT) que recebeu dieta padrão e um grupo hiperlipídico (HL), cuja dieta fornecia cerca de 60% de lipídeos em relação ao valor calórico total (destes cerca de 88% têm como fonte a banha de porco e o restante óleo de soja) por 3 dias, 1, 4 ou 8 semanas. A composição das dietas experimentais está descrita na tabela 1. A glicemia de jejum foi obtida ao final dos períodos experimentais após 12 horas de jejum em aparelho glicosímetro *Accu-Chek* (Performa, Brasil). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas com água e alimentos a vontade.

Ingredientes	CT	HL
Proteína (g %)	14	18,8
Carboidratos totais (g %)	72,1	36,2
Carboidratos simples (g %)	5	10
Lipídeos (g %)	4	35
Fibras (g %)	5	5
kcal/g	3,80	5,35

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais.

3.2 Dissecção do hipotálamo e extração de proteínas

O hipotálamo foi dissecado por meio de uma matriz (Zivic Rodent Brain Slicer Matrix, Zivic Instruments, Pittsburgh, USA) e em seguida homogeneizado em 400 µl de tampão 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 ortovanadato de sódio; 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina por meio de *Bead Ruptor* (Omni Inc., USA). Após, o conteúdo foi centrifugado a 11.000 RPM, 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado para o preparo de extrato total proteico. A concentração de proteína foi determinada por meio de Bradford com leitura a 595 nM em espectrofotômetro (BioTek, USA).

3.3 Imunoprecipitado

Para o ensaio de imunoprecipitação, 200 µg de proteína e 1,5 µg de anticorpo anti-LAMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, USA) foram adicionados aos microtubos e incubados em rotação constante durante 12 horas a 4°C. Após, *beads* de proteína A agarose foram adicionados e os tubos permaneceram em agitação por mais 3 horas. Em seguida, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. Três lavagens com tampão foram realizadas e o extrato que foi precipitado foi utilizado para corrida de gel, na qual as membranas foram blotadas com anticorpo anti-HSC-70 (Santa Cruz Biotechnology, USA).

3.4 Western Blot

Para o ensaio de western blot, 30 µg de proteína em tampão de Laemmli foi aplicada em cada poço do gel de poliacrilamida. As proteínas foram separadas pelo seu peso molecular durante a corrida de eletroforese e após foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, em aparelho de transferência *Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (BIO-RAD, USA) banhadas com tampão de transferência contendo 20% de metanol. A membrana foi pré incubada com uma solução de bloqueio (3 % de albumina; 10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 0,02 % de Tween 20) por 2 horas. Posteriormente, foi incubada cerca de 12 horas com um anticorpo primário. A detecção do complexo antígeno-anticorpo foi obtida por quimiluminescência utilizando ECL western blotting substrate (Thermo Scientific, USA), seguindo as orientações do fabricante. Após a revelação em

fotodocumentador, as bandas identificadas foram quantificadas por meio de densitometria óptica através do software Un-Scan-It (Silk Scientific, USA).

3.5 Extração de RNA e qRT-PCR

As amostras foram homogeneizadas em reagente de TRIzol (Invitrogen, São Paulo, Brasil) em *Bead Ruptor*. Em seguida foram centrifugadas a 10500 rpm, e o conteúdo total de RNA foi isolado de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria. Para a síntese de cDNA utilizou-se 3 µg de RNA por meio de *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA) seguindo as instruções do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, USA). O gene da actina (TaqMan™ - Applied Biosystems) foi usado como controle endógeno da reação. Os valores da expressão gênica foram obtidos pela análise dos resultados no programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, USA).

3.6 Tratamento intracerebroventricular (icv)

Camundongos adultos com 7 semanas de idade foram submetidos à cirurgia de estereotaxia em aparato Stoelting (MARCA), de acordo com o descrito previamente (PORTOVEDO et al., 2015). As coordenadas utilizadas para ventrículo lateral foram: ântero-posterior 0,34 mm, lateral 1,0 mm e profundidade 2,2 mm em relação ao Bregma. A eficiência do correto posicionamento da cânula foi testada pela resposta de ingestão hídrica após injeção icv com angiotensina II (2 µL, 10⁻⁶M; Sigma, USA).

3.7 Cultura de células

A linhagem de neurônios hipotalâmicos de camundongos GT1-7 foi cultivada em meio DMEN (4.5 mg/l de glicose, Thermo Scientific, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 µl/ml de penicilina e estreptomicina. Em todos os experimentos, as células foram plaqueadas, divididas em controle (contendo 167 µM de BSA) ou palmitato (50, 100, 250, 500 ou 1000 µM), ambos contendo 1% de SFB. O palmitato foi conjugado com BSA em uma proporção de 3 para 1 conforme descrito anteriormente (PORTOVEDO et al., 2015), ou seja, para 500 µM de palmitato havia uma concentração de 167 µM de albumina. Para alguns

experimentos foi utilizada a linhagem de células da micróglia BV-2. Estas células foram tratadas em diferentes concentrações de palmitato conjugado à albumina por 12 horas. Após o meio foi coletado e foi adicionado um novo meio contendo apenas o meio de cultura por 12 horas. Esse meio final foi retirado e adicionado às células GT1-7 para os experimentos de meio condicionado.

3.8 Extração de lipídeos e dosagem de ceramidas

Após o tratamento com palmitato foi adicionado 1 ml de metanol em cada poço da placa de cultura. As células foram coletadas e colocadas em um tubo de ensaio. Em seguida, 1 ml de clorofórmio foi adicionado aos tubos. Após armazenamento em freezer por 24 horas, foi adicionado aos tubos 100 µl de uma solução contendo 3N de NaOH e 1 ml de 1N de NaCl. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados a 900 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 500 µl de NaCl, 500 µl de metanol e 50 µl de NaOH. O conteúdo de ceramida foi medido por meio de reação com diacilglicerol cinase e ATP marcado. Após separação em placa de sílica (para cromatografia), o conteúdo de ceramida foi analisado por meio de filmes radiográficos.

3.9 High Content Screening (HCS)

Após os tratamentos, as células GT1-7 foram lavadas com PBS e fixadas por 2 minutos em metanol gelado. As células foram permeabilizadas com 0,25% de Triton diluído em PBS por 15 minutos. Em seguida, foram bloqueadas por 2 horas à temperatura ambiente com uma solução de 3% de albumina em PBS. Após, foram incubadas *overnight* com anticorpo primário para LAMP-2A (Abcam, USA) na proporção de 1:750 de anticorpo em PBS com 3% de albumina. No dia seguinte, a solução foi lavada e o anticorpo secundário (1:750) contendo flurosceína Alexafluor 488 (Abcam, USA) foi incubado por 2 horas. DAPI foi utilizado para marcação nuclear. Para a aquisição das imagens foi utilizado o equipamento de High Content Screening (ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging, Molecular Devices, USA). As imagens foram captadas com a objetiva de 20x e foram utilizadas 16 fotos por poço. O software utilizado foi o *MetaXPress* (Molecular Devices, USA). Para análise da fluorescência, a medida foi normalizada pela área do citoplasma da célula.

3.10 Análise dos resultados

Os resultados estão apresentados como média e erro padrão da média. Para a comparação de médias entre dois grupos, foi aplicado o teste t de Student para amostras independentes. Quando necessário, foi utilizada análise de variância (ANOVA) e teste *post-hoc* de Bonferroni. Em todos os casos o nível de significância para rejeição da hipótese de nula foi de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando o programa "GraphPad Prism", versão 5 (GraphPad Software, Inc. USA).

4. Resultados e discussão

4.1 O consumo de dieta hiperlipídica leva a distúrbios metabólicos

Os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HL) apresentaram maior peso corporal do que os alimentados com a dieta controle (CT) desde 3 dias de tratamento, sendo que a diferença foi mantida até o último tempo experimental (Figura 3 A). Além disso, estes animais apresentam maior massa de tecido adiposo branco epididimal em todos os tempos experimentais (Figura 3 B) e maior glicemia de jejum após 3 dias, 4 e 8 semanas de dieta HL (Figura 3 C). O consumo de dieta HL por 1 semana não alterou a glicemia de jejum entre os grupos (Figura 3 C).

Essas alterações precoces em parâmetros metabólicos de animais alimentados com dieta HL são bem documentadas na literatura (WINZELL e AHRÉN, 2004; BRØNS et al., 2009; SNOOK et al., 2016). Além disso, o rápido estabelecimento de intolerância a glicose e hiperinsulinemia em camundongos alimentados com dieta HL por 3 dias também foi encontrado em outros trabalhos (WILLIAMS et al., 2014; LEE et al., 2011). Williams e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos alimentados com uma dieta HL apresentam maior intolerância a glicose após 3 dias de consumo de dieta HL, sendo que, após 1 semana de consumo dessa dieta, os animais apresentam um decaimento de 20% nesta intolerância. Outro dado importante deste trabalho demonstrou, por meio de experimento com ingestão pareada de calorias, que a intolerância a glicose é rapidamente estabelecida nos animais que consomem a dieta HL de forma independente do valor calórico ingerido (WILLIAMS et al., 2014).

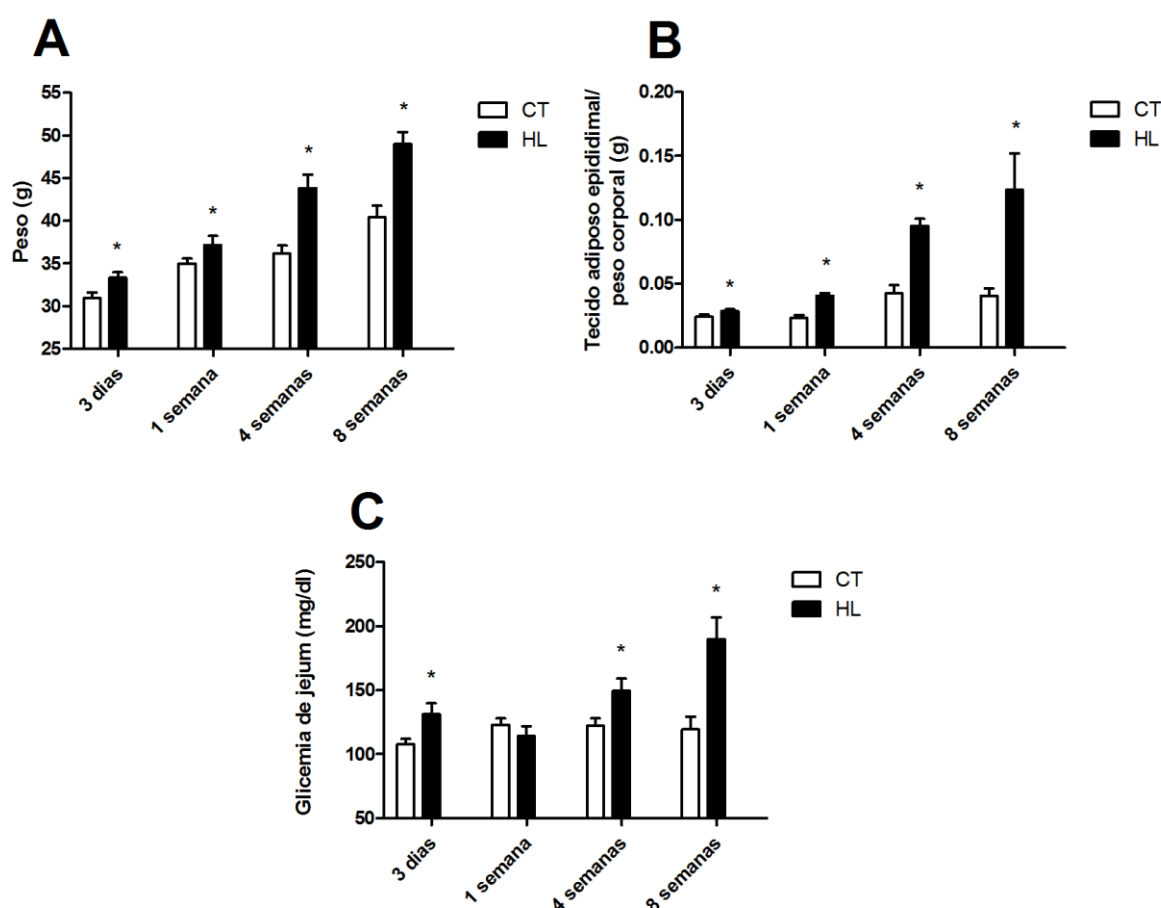


Figura 3 – Parâmetros metabólicos em camundongos alimentados com dieta CT ou HL por diferentes períodos experimentais. A - Peso corporal ao final do consumo de dieta CT ou HL por 3 dias, 1, 4 ou 8 semanas. **B -** Peso do tecido adiposo epididimal após o consumo de dieta CT ou HL por 3 dias, 1, 4 ou 8 semanas. **C-** Glicemia após 12 horas de jejum após o consumo de dieta CT ou HL por 3 dias, 1, 4 ou 8 semanas. n= 10 animais por grupo em todos os experimentos. * p < 0,05 teste t não pareado para cada tempo experimental. Os dados estão representados como média e erro padrão da média.

4.2 O consumo de dieta HL leva a alterações na maquinaria da CMA no hipotálamo

A associação entre a chaperona HSC-70 e a proteína lisossomal LAMP-2A é crucial para o funcionamento da CMA. Houve uma maior associação entre LAMP-2A e HSC-70 após o consumo de dieta HL por 3 dias (Figura 4 A). Em contrapartida, o conteúdo total destas proteínas neste período experimental foi diminuído em relação aos animais CT (Figura 4 B e C).

Após 1 semana de dieta HL, houve uma menor associação entre as

proteínas envolvidas na maquinaria da CMA (Figura 4 D) e uma diminuição no conteúdo de HSC-70 (Figura 4 F). Não foi encontrada diferença na LAMP-2A neste período experimental (Figura 4 E). Esses dados sugerem que há uma diminuição na atividade de CMA neste período. Esse achado é relevante, já que em outros modelos experimentais a diminuição da CMA gera efeitos deletérios na homeostasia celular (MASSEY et al., 2006; YANG et al., 2009). Por exemplo, o bloqueio da expressão de LAMP-2A em fibroblastos leva à maior sensibilidade destas células à agentes extressores (MASSEY et al., 2006). Ainda, no sistema nervoso central, a diminuição desse tipo de autofagia em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas leva à morte de neurônios (YANG et al., 2009).

O consumo prolongado da dieta HL leva a perda da homeostasia neuronal (DALVI et al., 2017) a tal ponto em que há ativação de morte neuronal por apoptose (MORAES et al., 2009). Por isso, investigamos os níveis de CMA em hipotálamo de camundongos alimentados com a dieta HL por um período mais longo, de 4 e 8 semanas. Em nosso modelo, o consumo crônico de dieta hiperlipídica levou a uma tendência, porém sem diferença estatística, à diminuição da associação entre HSC-70 e LAMP-2A no hipotálamo e no conteúdo total destas proteínas (Figura 4 G e H). Estes resultados demonstram, pela primeira vez, que o consumo de uma dieta rica em lipídeos leva a alteração na CMA em hipotálamo de roedores.

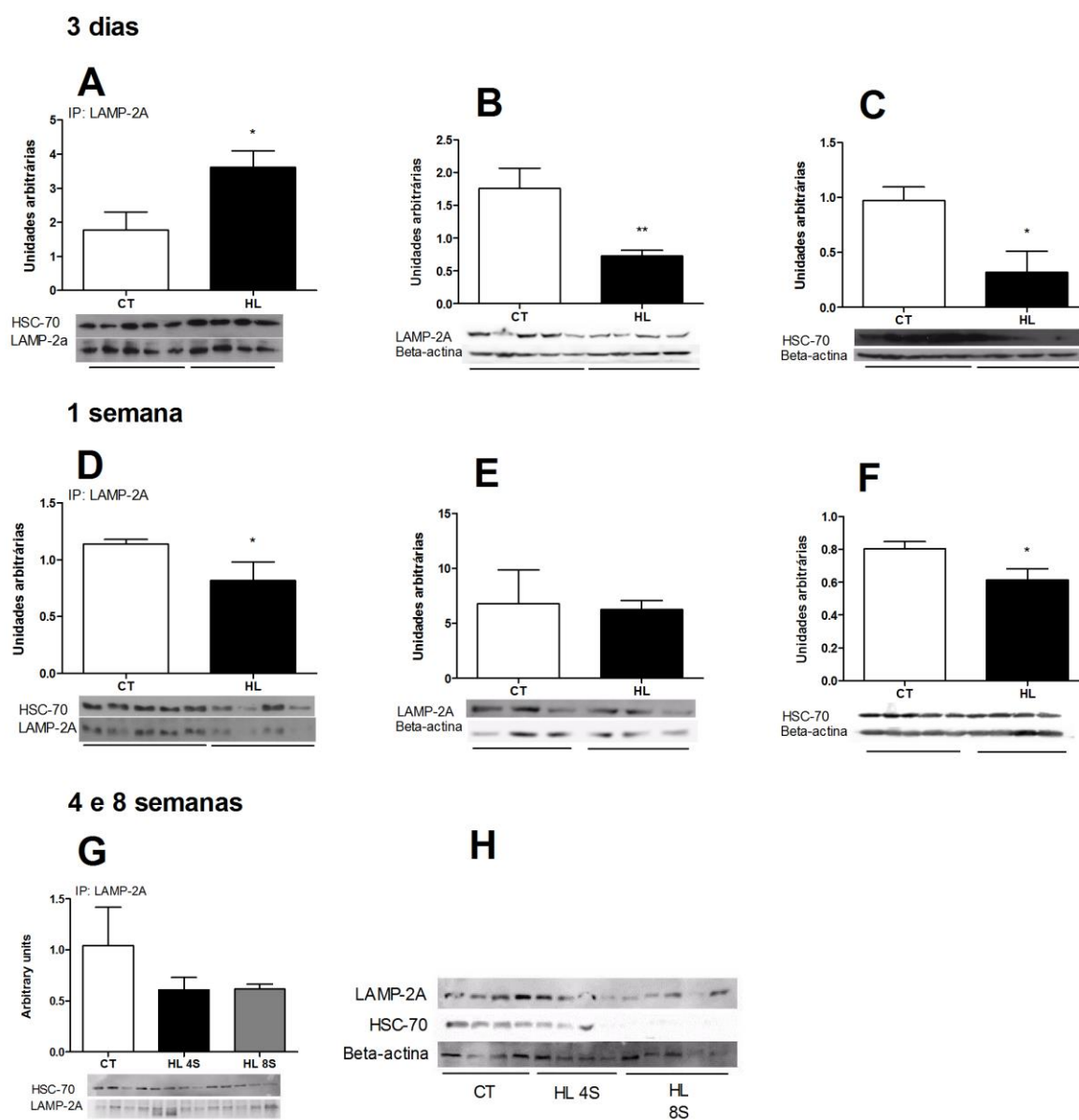


Figura 4 – A autofagia mediada por chaperonas após o consumo de dieta hiperlipídica por diferentes períodos. A - Imunoprecipitado de LAMP-2A seguido de *western blotting* de HSC-70 em hipotálamo de camundongos após 3 dias de consumo de dieta CT ou HL. **B e C** – Conteúdo de LAMP-2A e HSC-70 por *western blotting*, em hipotálamo de camundongos após 3 dias de consumo de dieta CT ou HL. **D** - Imunoprecipitado de LAMP-2A seguido de *western blotting* de HSC-70 em hipotálamo de camundongos após 1 semana de consumo de dieta CT ou HL. **E e F** - Conteúdo de LAMP-2A e HSC-70 por *western blotting*, em hipotálamo de camundongos após 1 semana de consumo de dieta CT ou HL. * $p < 0,05$ teste t não pareado. **G** - Imunoprecipitado de LAMP-2A seguido de *western blotting* de HSC-70 em hipotálamo de camundongos após 4 e 8 semanas de consumo de dieta CT ou HL. * $p < 0,05$ teste One-Way ANOVA seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. $n = 4-5$ animais por grupo para todos os experimentos. * $p < 0,05$. Os dados estão representados como média e erro padrão da média.

4.3 Expressão de citocinas no hipotálamo de camundongos obesos

A literatura relata de forma consistente que a obesidade está relacionada a um estado de inflamação crônica de baixo grau (HOTAMISLIGIL et al., 1996; DE SOUZA et al., 2005; MILANSKI et al., 2009), que parece se iniciar no hipotálamo (THALER et al., 2012). Verificamos que houve um aumento na expressão gênica de citocinas inflamatórias (*Il1b* e *Il6*) no hipotálamo de camundongos que receberam dieta HL por 3 dias (Figura 5 A). Além disso, houve aumento na *Il10*, uma citocina anti-inflamatória. Ademais, não foram encontradas diferenças na expressão destes mRNAs após o consumo de dieta HL por uma semana (Figura 5 A). Thaler e colaboradores (2012) mostraram um padrão similar no qual a ingestão de uma dieta HL por curto um período leva ao aumento da inflamação em hipotálamo, seguido pelo retorno da homeostasia após 1 semana. No entanto, o estado inflamatório volta a se estabelecer com o consumo crônico de dieta HL (DE SOUZA et al., 2005; MILANSKI et al., 2009).

O consumo excessivo de ácidos graxos saturados, aumenta os níveis destes lipídeos no hipotálamo, levando ao acúmulo de palmitato nessa região (VALDEARCOS et al., 2014), fato que reforça o seu papel na inflamação metabólica. Valdearcos e colaboradores (2014) demonstraram que após 3 dias de tratamento por gavagem com ácidos graxos saturados, há aumento de ativação de micróglia e produção de citocinas inflamatórias em hipotálamo de camundongos. Logo, o excesso de ácidos graxos saturados afeta diretamente a inflamação hipotalâmica de forma dependente das células da micróglia. Em contrapartida, o tratamento isocalórico com óleo de oliva, rico em ácidos graxos insaturados, não leva ao acúmulo e ativação de micróglia nesta região (VALDEARCOS et al., 2014).

Com relação à expressão de genes relacionados à autofagia, não houve diferença na expressão gênica de *Lamp2* e de *Tfeb*, um importante regulador da biogênese de lisossomos, após o consumo de dieta HL por 3 dias e 1 semana. Vale ressaltar que o conteúdo proteico de LAMP-2A é um fator limitante na ativação de CMA, porém, o mesmo pode ser regulado por diversos mecanismos, incluindo o controle transcricional e também sua mobilização para domínios da membrana do lisossomo que favorecem sua degradação por esta organela (RODRIGUEZ-NAVARRO et al., 2012).

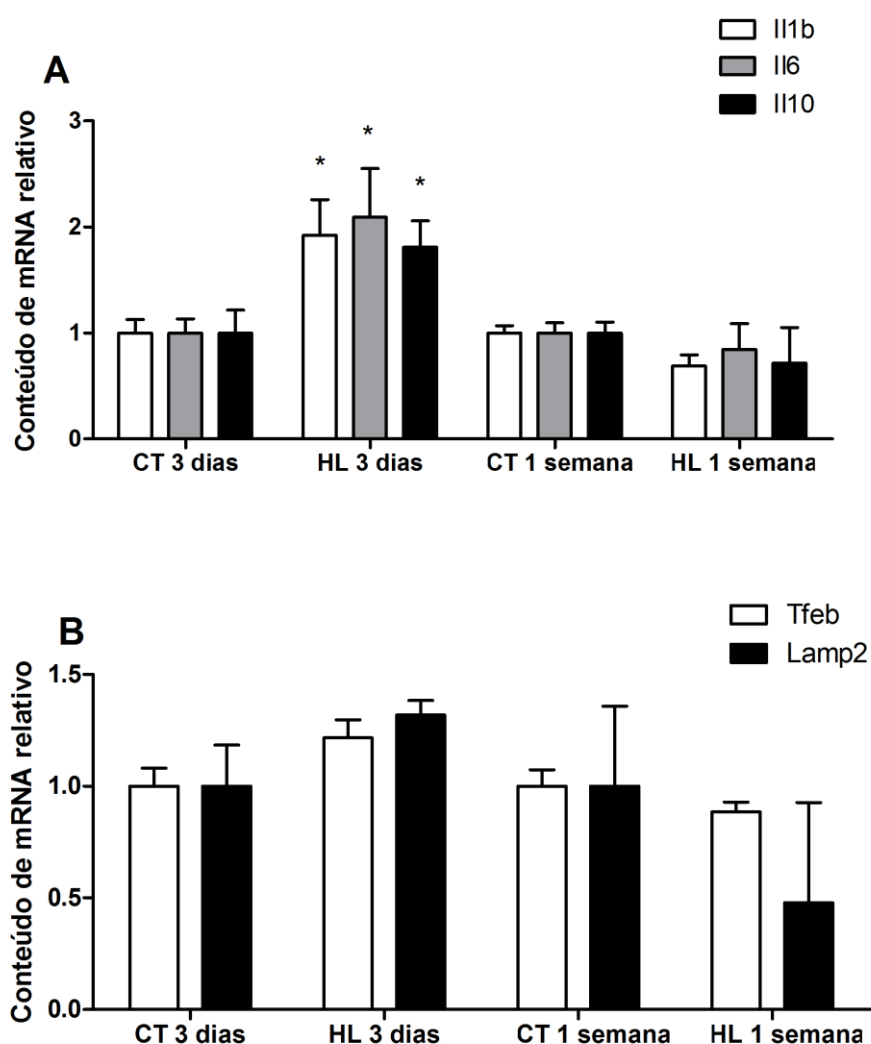


Figura 5 – O perfil na expressão de genes relacionados à inflamação e à autofagia em hipotálamo. n= 4-6 animais por grupo para todos os experimentos. A – Conteúdo relativo de mRNA de Il1b, Il6, Il10, Tfeb e Lamp2 após o consumo de dieta CT ou HL por 3 dias. B - Conteúdo relativo de mRNA de Il1b, Il6, Il10, Tfeb e Lamp2 após o consumo de dieta CT ou HL por 1 semana. * p < 0,05 teste t não pareado. Os dados estão representados como média e erro padrão da média.

4.4 O tratamento icv com palmitato altera o conteúdo de proteínas envolvidas na CMA no hipotálamo

O tratamento intracerebroventricular com ácidos graxos saturados leva à inflamação, ativação de estresse de retículo endoplasmático e de TLR4 em hipotálamo de camundongos (MILANSKI et al., 2009). Essa intervenção também é capaz diminuir a sinalização de insulina no hipotálamo (POSEY et al., 2009) e de

atenuar a supressão da produção hepática de glicose induzida pela insulina (BENOIT et al., 2009). Após o tratamento por 8 dias com palmitato, houve uma diminuição no conteúdo de HSC-70 no hipotálamo de camundongos, quando comparados aos controles que receberam apenas veículo (Figura 6 B). Não houve diferença na quantidade de LAMP-2A entre os tratamentos (Figura 6 A).

Com relação à homeostasia energética, os animais tratados com palmitato apresentaram menor ingestão alimentar, porém não houve diferença significativa no peso corporal e na glicemia de jejum ao fim do tratamento (Figura 6 C, D e E). Essa alteração na ingestão alimentar é esperada, já que neurônios do hipotálamo podem sofrer modulação em sua atividade em resposta à ácidos graxos (CRUCIANI-GUGLIELMACCI et al., 2004; MIGRENNE et al., 2006).

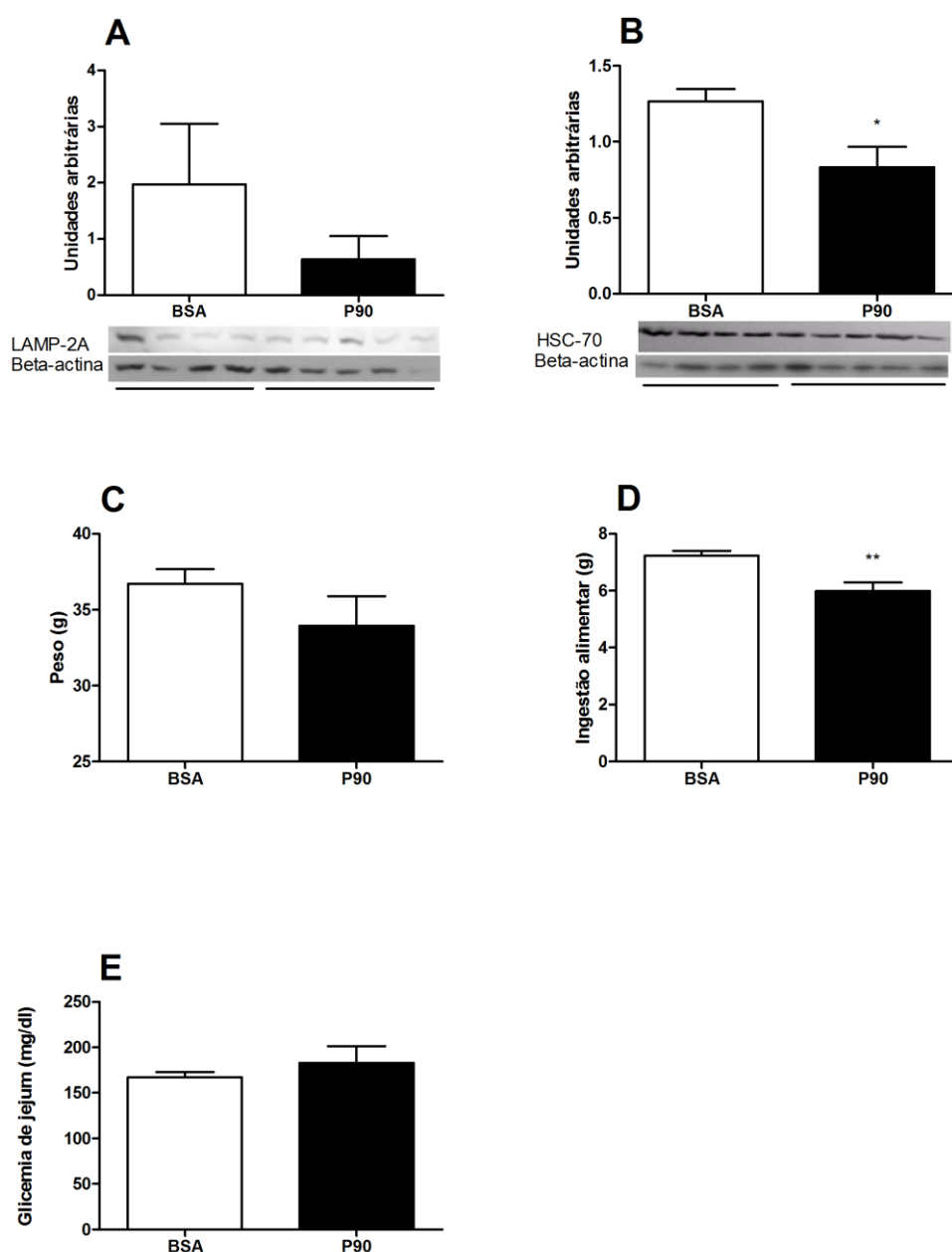


Figura 6 – O tratamento intracerebroventricular com palmitato modula o conteúdo de HSC-70 no hipotálamo. A e B – Conteúdo de LAMP-2A e HSC-70 por *western blotting* em animais tratados icv por 8 dias com veículo (BSA) ou 90 μ M de palmitato conjugado ao veículo na proporção de 3:1 (P90). **C –** Peso corporal em animais tratados icv por 8 dias com veículo (BSA) ou 90 μ M de palmitato conjugado ao veículo na proporção de 3:1 (P90). **D –** Ingestão alimentar em animais tratados icv por 8 dias com veículo (BSA) ou 90 μ M de palmitato conjugado ao veículo na proporção de 3:1 (P90). **E –** Glicemia de jejum em animais tratados icv por 8 dias com veículo (BSA) ou 90 μ M de palmitato conjugado ao veículo na proporção de 3:1 (P90). n= 4-5 animais por grupo para todos os experimentos. * p < 0,05 teste t não pareado. Os dados estão representados como média e erro padrão da média.

4.5 O tratamento com palmitato leva à ativação de CMA em neurônios do hipotálamo

Os neurônios hipotalâmicos parecem ser afetados diretamente pelo excesso de palmitato. A exposição a esse ácido graxo leva a ativação de estresse de retículo endoplasmático em cultura de neurônios do hipotálamo (CHOI et al., 2010; DALVi et al., 2017).

Por isso, analisamos a atividade de CMA em uma linhagem de células de neurônios hipotalâmicos, denominada GT1-7, tratadas com diferentes concentrações de palmitato por meio de *High Content Screening (HCS)*. Essa técnica permite, por meio de microscopia de fluorescência automatizada, a aquisição de imagens em alta resolução aliada a uma robusta análise quantitativa. Para validar o uso de HCS na análise da atividade de CMA, uma condição para mimetizar o jejum foi utilizada. Para isso, o soro fetal bovino foi retirado do meio de cultura por 24 horas. Sabe-se que a CMA atinge um patamar máximo de atividade em situações de jejum prolongado (WING et al., 1991; CUERVO et al., 1995). Consoante ao reportado previamente, a escassez de soro fetal bovino aumentou 57% da marcação de LAMP-2A em neurônios (Figura 7 A).

O tratamento com diferentes concentrações de palmitato, um ácido graxo saturado, foi capaz de induzir a ativação de CMA em neurônios hipotalâmicos. Concentrações fisiológicas levaram a um discreto, porém significativo aumento na CMA (11,3% e 8,7% com 50 μ M e 100 μ M respectivamente), enquanto que, concentrações supra-fisiológicas de 250 μ M e 500 μ M de palmitato levaram a um pronunciado aumento neste tipo de autofagia (39,8% e 23,8%, respectivamente) (Figura 7 A e C). Usualmente, o aumento de CMA está relacionado com a presença de estresse celular, já que neste contexto há maior formação de proteínas danificadas e com isso, maior requerimento dos sistemas de degradação de proteínas (KOGA et al., 2011).

O palmitato é o principal ácido graxo usado como substrato para síntese de ceramidas (CHOI; SNIDER, 2015). As ceramidas fazem parte do grupo de esfingolipídeos, que são lipídeos bioativos componentes de membranas celulares e que também exercem funções regulatórias na célula. A desregulação no

metabolismo de esfingolípídeos está associada à diversas doenças como câncer, doenças neurodegenerativas e doenças metabólicas (LI et al., 2014). O excesso de nutrientes, especialmente ácidos graxos saturados, leva ao aumento da síntese de ceramidas (HU et al., 2009; WATT et al., 2012). Por sua vez, o desbalanço no metabolismo de esfingolípídeos relacionado ao acúmulo de ceramidas, gera resistência à insulina em diversas células, incluindo neurônios do hipotálamo (CAMPANA et al., 2017). Em nosso modelo experimental, houve um aumento no conteúdo de ceramidas proporcional ao aumento nas concentrações de palmitato em células GT1-7 (Figura 7 B).

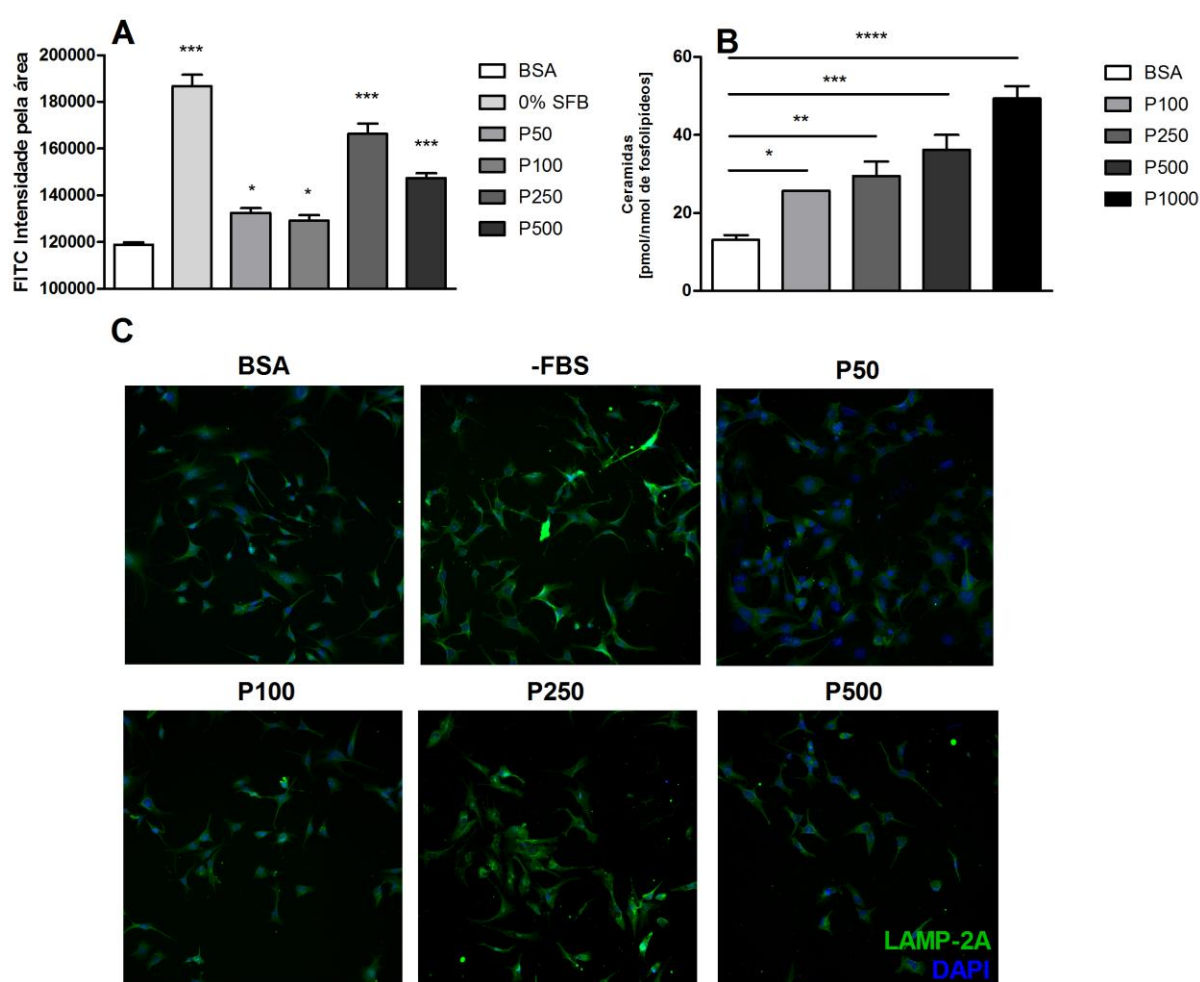


Figura 7 – A exposição ao palmitato leva à ativação de CMA em neurônios do hipotálamo. A – Análise de HCS com a intensidade da fluorescência normalizada pela área do citoplasma da marcação de LAMP-2A por Alexa Fluor 488 em células GT1-7 tratadas com veículo (BSA), meio de cultura sem soro fetal bovino (0% SFB) ou diferentes concentrações de palmitato conjugado à BSA por 24 horas. **B** – Quantificação de ceramidas por ensaio com diacilglicerol (DAG) quinase em células GT1-7 tratadas com veículo (BSA) ou diferentes concentrações de palmitato

conjugado à BSA. **C** – Figuras representativas da análise de HCS de células GT1-7 tratadas com veículo (BSA), meio de cultura sem soro fetal bovino (0% SFB) ou diferentes concentrações de palmitato conjugado à BSA por 24 horas. Figura B foram realizados 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $0,0001$ One-Way ANOVA seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. Os dados estão representados como média e erro padrão da média.

4.6 Citocinas e a ativação de CMA em neurônios do hipotálamo

As células da micróglia são determinantes na origem da inflamação hipotalâmica (VALDEARCOS et al., 2014, 2017). Este tipo celular parece ser ativado metabolicamente por ácidos graxos saturados, sendo que esta resposta medeia o desencadeamento de estresse celular em neurônios (VALDEARCOS et al., 2014). Isso porque a depleção farmacológica desse tipo celular ou a inibição de sua ativação reduz a gliose em hipotálamo mediobasal e previne o recrutamento de células mielóides em resposta ao excesso de lipídeos (VALDEARCOS et al., 2017). Esses efeitos são relevantes já que há presença de gliose no hipotálamo de roedores e humanos obesos (THALER et al., 2011), que por sua vez também contribui para a perpetuação da inflamação característica da obesidade (DOUGLASS et al., 2017).

Por isso, utilizamos uma mistura de citocinas inflamatórias (TNF α e IFN γ) em combinação com palmitato na concentração capaz de levar ao maior aumento na CMA em células GT1-7 (Figura 7 A). Encontramos que o tratamento com citocinas inflamatórias e palmitato levou ao aumento da CMA em relação ao controle, porém, esse aumento foi menor quando comparado ao tratamento com palmitato apenas (Figura 8 A). Seria interessante demonstrar se essa ativação de CMA nos diferentes tratamentos é suficiente para manter a proteostasia celular dos neurônios hipotalâmicos.

Além disso, os neurônios foram tratados com um meio condicionado de uma linhagem de células da micróglia, denominada BV-2, previamente tratada com palmitato. Semelhante ao encontrado quando os neurônios são diretamente expostos ao palmitato, o meio condicionado de células BV-2 tratadas com uma concentração de 100 μ M de palmitato levou à ativação de CMA nos neurônios do hipotálamo (Figura 8 B).

De forma geral, pode-se afirmar que a combinação de ácidos graxos

saturados com fatores inflamatórios leva a indução de CMA em neurônios do hipotálamo. No entanto seria interessante verificar se por um período mais longo essa ativação de CMA ainda conseguiria ser sustentada, já que em nossos experimentos com camundongos observamos que a exposição prolongada à dieta rica em lipídeos levou a diminuição da maquinaria de CMA no hipotálamo.

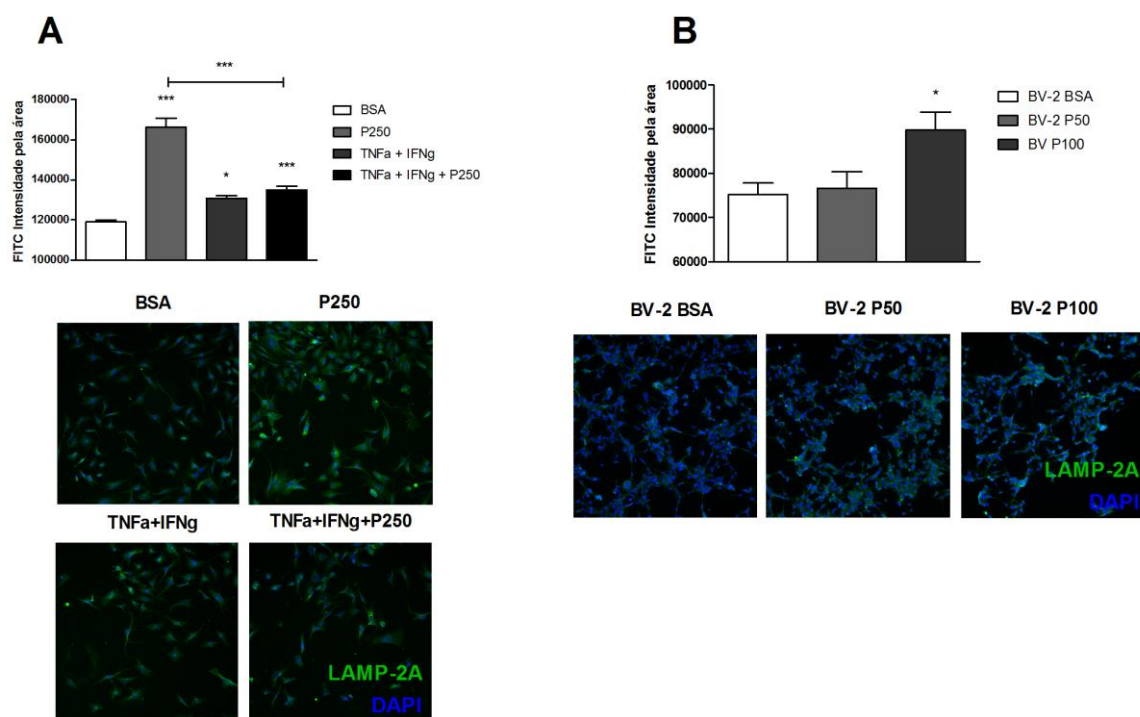


Figura 8 – A exposição à citocinas modula a ativação de CMA em neurônios do hipotálamo. A - Análise de HCS com a intensidade da fluorescência normalizada pela área do citoplasma da marcação de LAMP-2A por Alexa Fluor 488 em células GT1-7 tratadas com veículo (BSA), 250 μ M de palmitato conjugado à BSA e mistura de TNF α e IFN γ (10 ng/ml cada) por 24 horas. B - Análise de HCS com a intensidade da fluorescência normalizada pela área do citoplasma da marcação de LAMP-2A por Alexa Fluor 488 em células GT1-7 tratadas com meio condicionado de células BV-2 previamente tratadas com veículo (BSA) ou palmitato conjugado à BSA por 12 horas. * $p < 0,05$ e ***0,0001 One-Way ANOVA seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. Os dados estão representados como média e erro padrão da média.

De acordo com os resultados obtidos, podemos afirmar que a obesidade e o excesso de ácidos graxos saturados alteram a atividade de CMA em neurônios do hipotálamo. Sendo que, a ingestão de uma dieta rica em lipídeos por um curto período parece ativar esse tipo de autofagia nesta região do SNC. Em contrapartida, períodos mais longos de ingestão de dieta hiperlipídica parecem afetar de forma negativa os níveis de CMA em hipotálamo. Confirmando estes achados, por meio do

uso de uma linhagem celular de neurônios hipotalâmicos, demonstramos que o palmitato é capaz de ativar a autofagia mediada por chaperonas em neurônios, mesmo em concentrações altas. Seria interessante demonstrar se essa indução é capaz de preservar a proteostasia nesse tipo celular por períodos mais longos, já que em outros tipos celulares o excesso de lipídeos exerce um efeito negativo na indução de CMA (RODRIGUEZ-NAVARRO et al., 2012). Por fim, demonstramos que um meio inflamatório também leva à ativação de CMA em neurônios do hipotálamo.

Nossos achados sugerem que a CMA pode estar envolvida com a perda da proteostasia neuronal observada no hipotálamo de camundongos obesos (IGNACIO-SOUZA et al., 2014), pois a diminuição da CMA basal prejudica a proteção da célula contra estímulos inflamatórios e oxidativos (MASSEY et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2015). Ainda, a manutenção dos níveis de CMA durante o envelhecimento, por meio de manipulação genética, está associada ao menor acúmulo de proteínas danificadas e melhora na função hepática (ZHANG; CUERVO, 2008). Portanto, seria interessante demonstrar, por meio de manipulação genética ou dietética, se a indução de CMA em hipotálamo de camundongos é capaz de proteger as células neuronais do acúmulo de proteínas disfuncionais e perda da funcionalidade de neurônios.

Outra perspectiva relevante é o impacto que a modulação da CMA exerce em vias de sinalização específicas. Como exemplo temos o I κ B α , uma proteína responsável por manter a sinalização da via de NF κ B inativa, e que também é alvo da CMA. No entanto, o papel da regulação de NF κ B pela autofagia mediada por chaperonas em neurônios do hipotálamo ainda é desconhecido.

5. Conclusão

O presente trabalho demonstra pela primeira vez que a obesidade e o excesso de lipídeos modulam a atividade de CMA no sistema nervoso central, mais especificamente, no hipotálamo. Considerando que a CMA atua como um importante mecanismo no controle da homeostasia proteica, e que por sua vez, a perda nesse controle leva a maior susceptibilidade da célula a estímulos estressores e até mesmo à morte, este trabalho coloca a CMA em um papel central na disfunção neuronal e perpetuação da inflamação hipotalâmica nos modelos de obesidade.

Referências

- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499–511, jul. 2004.
- ARIAS, E.; KOGA, H.; DIAZ, A.; MOCHOLI, E.; PATEL, B.; MARÍA, A.; CORRESPONDENCE, C.; CUERVO, A. M. Lysosomal mTORC2/PHLPP1/Akt Regulate Chaperone-Mediated Autophagy. **Molecular Cell**, v. 59, p. 270–284, 2015.
- BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. suppl 1, p. S181–S191, 2003.
- BENOIT, S. C.; KEMP, C. J.; ELIAS, C. F.; ABPLANALP, W.; HERMAN, J. P.; MIGRENNE, S.; LEFEVRE, A.-L.; CRUCIANI-GUGLIELMACCI, C.; MAGNAN, C.; YU, F.; NISWENDER, K.; IRANI, B. G.; HOLLAND, W. L.; CLEGG, D. J. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 9, p. 2577–89, set. 2009.
- BENZLER, J.; GANJAM, G. K.; PRETZ, D.; OELKRUG, R.; KOCH, C. E.; LEGLER, K.; STÖHR, S.; CULMSEE, C.; WILLIAMS, L. M.; TUPS, A. Central inhibition of IKK β /NF- κ B signaling attenuates high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. **Diabetes**, v. 64, n. 6, p. 2015–2027, 2015.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009): Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. **Rio de Janeiro: IBGE**; 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis. **Brasília, DF**; 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2016 – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico. **Brasília, DF**; 2017.
- BRØNS, C.; JENSEN, C. B.; STORGAARD, H.; HISCOCK, N. J.; WHITE, A.; APPEL, J. S.; JACOBSEN, S.; NILSSON, E.; LARSEN, C. M.; ASTRUP, A.;

QUISTORFF, B.; VAAG, A. Impact of short-term high-fat feeding on glucose and insulin metabolism in young healthy men. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 10, p. 2387–2397, 15 maio 2009.

CAKIR, I.; CYR, N. E.; PERELLO, M.; LITVINOV, B. P.; ROMERO, A.; STUART, R. C.; NILLNI, E. A. Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 24, p. 17675–88, 14 jun. 2013.

CAMPANA, M.; BELLINI, L.; ROUCH, C.; RACHDI, L.; COANT, N.; BUTIN, N.; BANDET, C. L.; PHILIPPE, E.; MENEYROL, K.; KASSIS, N.; DAIROU, J.; HAJDUCH, E.; COLSCH, B.; MAGNAN, C.; LE STUNFF, H. Inhibition of central de novo ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances β -cell function of obese Zucker rats. **Molecular Metabolism**, 7 nov. 2017.

CAVADAS, C.; AVELEIRA, C. A.; SOUZA, G. F. P.; VELLOSO, L. A. The pathophysiology of defective proteostasis in the hypothalamus — from obesity to ageing. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 12, p. 723–733, 8 jul. 2016.

CHIANG, H. L.; TERLECKY, S. R.; PLANT, C. P.; DICE, J. F. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. **Science (New York, N.Y.)**, v. 246, n. 4928, p. 382–5, 20 out. 1989.

CHOI, S. J.; KIM, F.; SCHWARTZ, M. W.; WISSE, B. E. Cultured hypothalamic neurons are resistant to inflammation and insulin resistance induced by saturated fatty acids. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 298, n. 6, p. E1122-30, jun. 2010.

CHOI, S.; SNIDER, A. J. Sphingolipids in High Fat Diet and Obesity-Related Diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 520618, 2015.

CIECHANOVER, A.; KWON, Y. T. Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration. **Frontiers in neuroscience**, v. 11, p. 185, 2017.

CONE, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 571–578, 1 maio 2005.

COUPÉ, B.; ISHII, Y.; DIETRICH, M. O.; KOMATSU, M.; HORVATH, T. L.; BOURET, S. G. Loss of Autophagy in Pro-opiomelanocortin Neurons Perturbs Axon Growth and Causes Metabolic Dysregulation. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 2, p. 247–255, 8 fev. 2012.

COUTINHO, J. G.; GENTIL, P. C.; TORAL, N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. suppl 2, p. s332–s340, 2008.

CRUCIANI-GUGLIELMACCI, C.; HERVALET, A.; DOUARED, L.; SANDERS, N. M.; LEVIN, B. E.; KTORZA, A.; MAGNAN, C. Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats. **Diabetologia**, v. 47, n. 11, p. 2032–2038, 30 nov. 2004.

CRUCIANI-GUGLIELMACCI, C.; LÓPEZ, M.; CAMPANA, M.; LE STUNFF, H. Brain Ceramide Metabolism in the Control of Energy Balance. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 787, 2017.

CUERVO, A. M.; HU, W.; LIM, B.; DICE, J. F. IkappaB is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. **Molecular biology of the cell**, v. 9, n. 8, p. 1995–2010, ago. 1998.

CUERVO, A. M.; KNECHT, E.; TERLECKY, S. R.; DICE, J. F. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 269, n. 5, p. C1200–C1208, nov. 1995.

CUERVO, A. M.; STEFANIS, L.; FREDENBURG, R.; LANSBURY, P. T.; SULZER, D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5688, p. 1292–5, 27 ago. 2004.

DALVI, P. S.; CHALMERS, J. A.; LUO, V.; HAN, D.-Y.; WELLHAUSER, L.; LIU, Y.; TRAN, D. Q.; CASTEL, J.; LUQUET, S.; WHEELER, M. B.; BELSHAM, D. D. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF- α on appetite-regulating NPY neurons. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 1, p. 149–158, 24 jan. 2017.

DE SOUZA, C. T.; ARAUJO, E. P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R. L.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. A.; VELLOSO, L. A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192–4199, 2005.

DOUGLASS, J. D.; DORFMAN, M. D.; FASNACHT, R.; SHAFFER, L. D.; THALER, J. P. Astrocyte IKK β /NF- κ B signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. **Molecular metabolism**, v. 6, n. 4, p. 366–373, abr. 2017.

DICE, J. F. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. **Trends in biochemical sciences**, v. 15, n. 8, p. 305–9, 1 ago. 1990.

DIKIC, I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 193–224, 20 jun. 2017.

ESPOSITO, K.; PONTILLO, A.; CIOTOLA, M.; DI PALO, C.; GRELLA, E.; NICOLETTI, G.; GIUGLIANO, D. Weight Loss Reduces Interleukin-18 Levels in Obese Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 8, p. 3864–3866, ago. 2002.

ESPOSITO, K.; PONTILLO, A.; DI PALO, C.; GIUGLIANO, G.; MASELLA, M.; MARFELLA, R.; GIUGLIANO, D. Effect of Weight Loss and Lifestyle Changes on Vascular Inflammatory Markers in Obese Women. **JAMA**, v. 289, n. 14, p. 1799, 9 abr. 2003.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 13, p. 1811–1836, 2017.

GAO, L.; SHE, H.; LI, W.; ZENG, J.; ZHU, J.; JONES, D. P.; MAO, Z.; GAO, G.; YANG, Q. Oxidation of Survival Factor MEF2D in Neuronal Death and Parkinson's Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 18, p. 2936–2948, 20 jun. 2014.

HOOPER, L.; ABDELHAMID, A.; MOORE, H. J.; DOUTHWAITE, W.; SKEAFF, C. M.; SUMMERBELL, C. D. Effect of reducing total fat intake on body weight: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and cohort studies. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 345, p. e7666, 6 dez. 2012.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**. 444(14): 860-7, Dec. 2006.

HOTAMISLIGIL, G.; SHARGILL, N.; SPIEGELMAN, B. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1 jan. 1993.

HU, W.; BIELAWSKI, J.; SAMAD, F.; MERRILL, A. H.; COWART, L. A. Palmitate increases sphingosine-1-phosphate in C2C12 myotubes via upregulation of sphingosine kinase message and activity. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 9, p. 1852–1862, set. 2009.

IGNACIO-SOUZA, L. M.; BOMBASSARO, B.; PASCOAL, L. B.; PORTOVEDO, M. A.; RAZOLLI, D. S.; COOPE, A.; VICTORIO, S. C.; DE MOURA, R. F.; NASCIMENTO, L. F.; ARRUDA, A. P.; ANHE, G. F.; MILANSKI, M.; VELLOSO, L. A. Defective Regulation of the Ubiquitin/Proteasome System in the Hypothalamus of Obese Male Mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 2831–2844, ago. 2014.

JACKSON, M. P.; HEWITT, E. W. Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 2, p. 173–180, 15 out. 2016.

KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. **Trends Cell Biol.** v. 22, n. 8, p. 407–417, 2013.

KAUSHIK, S.; RODRIGUEZ-NAVARRO, J. A.; ARIAS, E.; KIFFIN, R.; SAHU, S.; SCHWARTZ, G. J.; CUERVO, A. M.; SINGH, R. Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. **Cell metabolism**, v. 14, n. 2, p. 173–83, 3 ago. 2011.

KIFFIN, R.; CHRISTIAN, C.; KNECHT, E.; CUERVO, A. M. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 11, p. 4829–40, nov. 2004.

KOGA, H.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 43, n. 1, p. 29–37, 2011.

KOGA, H.; MARTINEZ-VICENTE, M.; ARIAS, E.; KAUSHIK, S.; SULZER, D.; CUERVO, A. M. Constitutive Upregulation of Chaperone-Mediated Autophagy in Huntington's Disease. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 50, p. 18492–18505, 14 dez. 2011.

KRASHES, M. J.; LOWELL, B. B.; GARFIELD, A. S. Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis. **Nature neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 206–19, fev. 2016.

LEE, Y. S.; LI, P.; HUH, J. Y.; HWANG, I. J.; LU, M.; KIM, J. I.; HAM, M.; TALUKDAR, S.; CHEN, A.; LU, W. J.; BANDYOPADHYAY, G. K.; SCHWENDENER, R.; OLEFSKY, J.; KIM, J. B. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2474–83, 1 out. 2011.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 2, p. 201–205, 10 jan. 2017.

LI, Y.; LI, S.; QIN, X.; HOU, W.; DONG, H.; YAO, L.; XIONG, L. The pleiotropic roles of sphingolipid signaling in autophagy. **Cell death & disease**, v. 5, p. 1–11, 2014.

MANDL, J.; MÉSZÁROS, T.; BÁNHEGYI, G.; HUNYADY, L.; CSALA, M. Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 194–201, maio 2009.

MASSEY, A. C.; KAUSHIK, S.; SOVAK, G.; KIFFIN, R.; CUERVO, A. M. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 15, p. 5805–10, 11 abr. 2006.

MENG, Q.; CAI, D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase beta (IKK β)/NF- κ B pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 37, p. 32324–32, 16 set. 2011.

MIGRENNE, S.; CRUCIANI-GUGLIELMACCI, C.; KANG, L.; WANG, R.; ROUCH, C.; LEFEVRE, A.-L.; KTORZA, A.; ROUTH, V. H.; LEVIN, B. E.; MAGNAN, C. Fatty Acid Signaling in the Hypothalamus and the Neural Control of Insulin Secretion. **Diabetes**, v. 55, n. Supplement 2, p. S139–S144, 1 dez. 2006.

MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D. E.; et al. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 359–370, 2009.

MORAES, J. C.; COOPE, A.; MORARI, J.; CINTRA, D. E.; ROMAN, E. A.; PAULI, J. R.; ROMANATTO, T.; CARVALHEIRA, J. B.; OLIVEIRA, A. L. R.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. High-Fat Diet Induces Apoptosis of Hypothalamic Neurons. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. e5045, 2 abr. 2009.

MÜNZBERG, H.; FLIER, J. S.; BJØRBÆK, C. Region-Specific Leptin Resistance within the Hypothalamus of Diet-Induced Obese Mice. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4880–4889, nov. 2004.

MÜNZBERG, H.; FLIER, J. S.; BJØRBÆK, C. Region-Specific Leptin Resistance within the Hypothalamus of Diet-Induced Obese Mice. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4880–4889, nov. 2004.

NISWENDER, K. D.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 5, n. 8, p. 362-9., 1 out. 2004.

OLOFSSON, L. E.; UNGER, E. K.; CHEUNG, C. C.; XU, A. W. Modulation of AgRP-neuronal function by SOCS3 as an initiating event in diet-induced hypothalamic leptin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 8, p. E697-706, 19 fev. 2013.

ORENSTEIN, S.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 21, n. 7, p. 719–726, 2010.

PARZYCH, K. R.; KLIONSKY, D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 3, p. 460–473, 2014.

PINHEIRO, A. R. de O.; FREITAS, S. F. T. de; CORSO, A. C. T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 523–533, dez. 2004.

PORTOVEDO, M.; IGNACIO-SOUZA, L. M.; BOMBASSARO, B.; COOPE, A.; REGINATO, A.; RAZOLLI, D. S.; TORSONI, M. A.; TORSONI, A. S.; LEAL, R. F.; VELLOSO, L. A.; MILANSKI, M. Saturated fatty acids modulate autophagy's proteins in the hypothalamus. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

POSEY, K. A.; CLEGG, D. J.; PRINTZ, R. L.; BYUN, J.; MORTON, G. J.; VIVEKANANDAN-GIRI, A.; PENNATHUR, S.; BASKIN, D. G.; HEINECKE, J. W.; WOODS, S. C.; SCHWARTZ, M. W.; NISWENDER, K. D. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 296, n. 5, p. E1003-12, maio 2009.

PROSPECTIVE STUDIES COLLABORATION, P. S.; WHITLOCK, G.; LEWINGTON, S.; SHERLIKER, P.; CLARKE, R.; EMBERSON, J.; HALSEY, J.; QIZILBASH, N.; COLLINS, R.; PETO, R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. **Lancet (London, England)**, v. 373, n. 9669, p. 1083–96, 28 mar. 2009.

QUAN, W.; KIM, H.-K.; MOON, E.-Y.; KIM, S. S.; CHOI, C. S.; KOMATSU, M.; JEONG, Y. T.; LEE, M.-K.; KIM, K.-W.; KIM, M.-S.; LEE, M.-S. Role of Hypothalamic Proopiomelanocortin Neuron Autophagy in the Control of Appetite and Leptin Response. **Endocrinology**, v. 153, n. 4, p. 1817–1826, abr. 2012.

RAVANAN, P.; SRIKUMAR, I. F.; TALWAR, P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. **Life Sciences**, 2017.

ROBBLEE, M. M.; KIM, C. C.; ABATE, J. P.; VALDEARCOS, M.; SANDLUND, K. L. M.; SHENOY, M. K.; VOLMER, R.; IWAWAKI, T.; KOLIWAD, S. K. Saturated Fatty

Acids Engage an IRE1 α -Dependent Pathway to Activate the NLRP3 Inflammasome in Myeloid Cells. **Cell Reports**, v. 14, n. 11, p. 2611–2623, 2016.

RODRIGUEZ-NAVARRO, J. A.; KAUSHIK, S.; KOGA, H.; DALL'ARMI, C.; SHUI, G.; WENK, M. R.; DI PAOLO, G.; CUERVO, A. M. Inhibitory effect of dietary lipids on chaperone-mediated autophagy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 12, p. E705–E714, 2012.

ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L. 20 years of leptin: role of leptin in energy homeostasis in humans. **The Journal of endocrinology**, v. 223, n. 1, p. T83-96, out. 2014.

RTVELADZE, K.; MARSH, T.; WEBBER, L.; KILPI, F.; LEVY, D.; CONDE, W.; MCPHERSON, K.; BROWN, M. Health and Economic Burden of Obesity in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

SCHNEIDER, J. L.; VILLARROYA, J.; DIAZ-CARRETERO, A.; PATEL, B.; URBANSKA, A. M.; THI, M. M.; VILLARROYA, F.; SANTAMBROGIO, L.; CUERVO, A. M. Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. **Aging Cell**, v. 14, n. 2, p. 249–264, 1 abr. 2015.

SNOOK, L. A.; MACPHERSON, R. E. K.; MONACO, C. M. F.; FRENDON-CUMBO, S.; CASTELLANI, L.; PEPPLER, W. T.; ANDERSON, Z. G.; BUZELLE, S. L.; LEBLANC, P. J.; HOLLOWAY, G. P.; WRIGHT, D. C. Prior exercise training blunts short-term high-fat diet-induced weight gain. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 311, n. 2, p. R315–R324, 1 ago. 2016.

SZEGEZDI, E.; MACDONALD, D. C.; NÍ CHONGHAILE, T.; GUPTA, S.; SAMALI, A. Bcl-2 family on guard at the ER. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 296, n. 5, p. C941–C953, may 2009.

TASSET, I.; CUERVO, A. M. Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. **FEBS Journal**, 2016. .

THALER, J.; YI, C.; SCHUR, E.; GUYENET, S.; HWANG, B.; DIETRICH, M.; ZHAO, X.; SARRUF, D.; IZGUR, V.; MARAVILLA, K.; NGUYEN, H.; FISCHER, J.; MATSEN, M.; WISSE, B.; MORTON, G.; HORVARTH, T.; BASKIN, D.; TSHOP, M.;

SCHWARTZ, M. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, p. 153, 2011.

TREMME, M.; GERDTHAM, U.-G.; NILSSON, P.; SAHA, S. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 4, p. 435, 2017.

TSE, E. K.; BELSHAM, D. D. 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**, nov. 2017.

VALDEARCOS, M.; ROBBLEE, M. M.; BENJAMIN, D. I.; NOMURA, D. K.; XU, A. W.; KOLIWAD, S. K. Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. **Cell Reports**, v. 9, n. 6, p. 2124–2139, 2014.

VALDEARCOS, M.; DOUGLASS, J. D.; ROBBLEE, M. M.; DORFMAN, M. D.; STIFLER, D. R.; BENNETT, M. L.; GERRITSE, I.; FASNACHT, R.; BARRES, B. A.; THALER, J. P.; KOLIWAD, S. K. Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility. **Cell metabolism**, v. 26, n. 1, p. 185–197.e3, 5 jul. 2017.

VALDOR, R.; MOCHOLI, E.; BOTBOL, Y.; GUERRERO-ROS, I.; CHANDRA, D.; KOGA, H.; GRAVEKAMP, C.; CUERVO, A. M.; MACIAN, F. Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. **Nature Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1046–1054, 28 set. 2014.

VAN DE SANDE-LEE, S.; PEREIRA, F. R. S.; CINTRA, D. E.; FERNANDES, P. T.; CARDOSO, A. R.; GARLIPP, C. R.; CHAIM, E. A.; PAREJA, J. C.; GELONEZE, B.; LI, L. M.; CENDES, F.; VELLOSO, L. A. Partial Reversibility of Hypothalamic Dysfunction and Changes in Brain Activity After Body Mass Reduction in Obese Subjects. **Diabetes**, v. 60, n. 6, p. 1699–1704, 1 jun. 2011.

VOGIATZI, T.; XILOURI, M.; VEKRELLIS, K.; STEFANIS, L. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in

neuronal cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 35, p. 23542–56, 29 ago. 2008.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 185–194, jan. 2010.

WANG, D. D.; LI, Y.; CHIUVE, S. E.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E.; RIMM, E. B.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Association of Specific Dietary Fats With Total and Cause-Specific Mortality. **JAMA Internal Medicine**, v. 176, n. 8, p. 1134, 1 ago. 2016.

WATT, M. J.; BARNETT, A. C.; BRUCE, C. R.; SCHENK, S.; HOROWITZ, J. F.; HOY, A. J. Regulation of plasma ceramide levels with fatty acid oversupply: evidence that the liver detects and secretes de novo synthesised ceramide. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2741–2746, 27 out. 2012.

WEISSMAN, A. M.; SHABEK, N.; CIECHANOVER, A. The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 9, p. 605–620, 23 ago. 2011.

WHO | Obesity and overweight [Internet]. [citado 2017 dez 17]; Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

WILLIAMS, L. M.; CAMPBELL, F. M.; DREW, J. E.; KOCH, C.; HOGGARD, N.; REES, W. D.; KAMOLRAT, T.; THI NGO, H.; STEFFENSEN, I.-L.; GRAY, S. R.; TUPS, A. The Development of Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance in C57Bl/6 Mice on a High-Fat Diet Consists of Distinct Phases. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e106159, 29 ago. 2014.

WING, S. S.; CHIANG, H. L.; GOLDBERG, A. L.; DICE, J. F. Proteins containing peptide sequences related to Lys-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver and heart, but not skeletal muscle, of fasted rats. **The Biochemical journal**, v. 275 (Pt 1), n. Pt 1, p. 165–9, 1 abr. 1991.

WINZELL, M. S.; AHRÉN, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 3, p. S215-9, dez. 2004.

XILOURI, M.; VOGIATZI, T.; VEKRELLIS, K.; PARK, D.; STEFANIS, L. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. **PloS one**, v. 4, n. 5, p. e5515, 2009.

XU, Y.; JAGANNATH, C.; LIU, X.-D.; SHARAFKHANEH, A.; KOLODZIEJSKA, K. E.; EISSA, N. T. Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 135–144, jul. 2007.

XU, Y.; JAGANNATH, C.; LIU, X.-D.; SHARAFKHANEH, A.; KOLODZIEJSKA, K. E.; EISSA, N. T. Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 135–144, jul. 2007.

YANG, Q.; SHE, H.; GEARING, M.; COLLA, E.; LEE, M.; SHACKA, J. J.; MAO, Z. Regulation of Neuronal Survival Factor MEF2D by Chaperone-Mediated Autophagy. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 124–127, 2 jan. 2009.

YULYANINGSIH, E.; RUDENKO, I. A.; VALDEARCOS, M.; DAHLÉN, E.; VAGENA, E.; CHAN, A.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; VAISSE, C.; KOLIWAD, S. K.; XU, A. W. Acute Lesioning and Rapid Repair of Hypothalamic Neurons outside the Blood-Brain Barrier. **Cell reports**, v. 19, n. 11, p. 2257–2271, 13 jun. 2017.

ZHANG, C.; CUERVO, A. M. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. **Nature medicine**, v. 14, n. 9, p. 959–65, set. 2008.

ZHANG, X.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; KARIN, M.; BAI, H.; CAI, D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 61–73, 3 out. 2008.

ZICCARDI, P.; NAPPO, F.; GIUGLIANO, G.; ESPOSITO, K.; MARFELLA, R.; CIOFFI, M.; D'ANDREA, F.; MOLINARI, A. M.; GIUGLIANO, D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. **Circulation**, v. 105, n. 7, p. 804–9, 19 fev. 2002.

HANZEL, C. E.; PICHET-BINETTE, A.; PIMENTEL, L. S. B.; IULITA, M. F.; ALLARD, S.; DUCATENZEILER, A.; DO CARMO, S.; CUELLO, A. C. Neuronal driven pre-plaque inflammation in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 10, p. 2249–2262, 1 out. 2014.

GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C.; GAGE, F. H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918–934, 2010.

SUDDUTH, T. L.; SCHMITT, F. A.; NELSON, P. T.; WILCOCK, D. M. Neuroinflammatory phenotype in early Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 34, n. 4, p. 1051–9, abr. 2013.

CRIBBS, D. H.; BERCHTOLD, N. C.; PERREAU, V.; COLEMAN, P. D.; ROGERS, J.; TENNER, A. J.; COTMAN, C. W. Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, p. 179, 23 jul. 2012.

ENGELHART, M. J.; GEERLINGS, M. I.; MEIJER, J.; KILIAAN, A.; RUITENBERG, A.; VAN SWIETEN, J. C.; STIJNEN, T.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J. C. M.; BRETELER, M. M. B. Inflammatory Proteins in Plasma and the Risk of Dementia. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 5, p. 668, 1 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15148142>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

Anexo A - Parecer do comitê de ética em pesquisa



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Modulação da autofagia mediada por chaperonas em hipotálamo de animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica**, registrada com o nº **4245-1**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Marciane Milanski Ferreira e Mariana Portovedo De Oliveira Araújo**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **04 de julho de 2016**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	05/07/2016-15/12/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	05/07/2016-15/12/2018
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongos Heterogênicos / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	56
Peso / Idade:	06 semanas / 30g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 04 de julho de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Anexo B - Co-autoria de artigos durante o período de doutorado

1. Miyamoto JE, Ferraz AC, **Portovedo** M, Reginato A, Stahl MA, Ignácio-Souza LM, Chan KL, Torsoni AS, Torsoni MA, Ribeiro APB, Milanski M. Interesterified soybean oil promotes weight gain, impaired glucose tolerance and increased liver cellular stress markers. Submetido: The Journal of Nutritional Biochemistry
2. Coope A, Pascoal LB, da Silva FAR, Botezelli JD, Ayrizono MLS, Milanski M, Camargo MG, Planell N, **Portovedo** M, Dias CB, Fagundes JJ, Leal RF. Transcriptional and Molecular Pathways Activated in Mesenteric Adipose Tissue and Intestinal Mucosa of Crohn's Disease Patients. Int J Inflam. 2017; 2017. doi: 10.1155/2017/7646859.
3. Silva KO, Pereira Sda C, **Portovedo** M, Milanski M, Galindo LC, Guzmán-Quevedo O, Manhães-de-Castro R, Toscano AE. Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. Int J Dev Neurosci. 2016 Aug; doi: 10.1016/j.ijdevneu.2016.05.002.
4. Reginato A, de Fante T, **Portovedo** M, da Costa NF, Payolla TB, Miyamoto JÉ, Simino LA, Ignácio-Souza LM, Torsoni MA, Torsoni AS, Milanski M. Autophagy proteins are modulated in the liver and hypothalamus of the offspring of mice with diet-induced obesity. J Nutr Biochem. 2016 Aug; doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.04.002.
5. **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 doi: 10.1371/journal.pone.0119850.
6. Ignacio-Souza LM, Bombassaro B, Pascoal LB, **Portovedo** MA, Razolli DS, Coope A, Victorio SC, de Moura RF, Nascimento LF, Arruda AP, Anhe GF, Milanski M, Velloso LA. Defective regulation of the ubiquitin/proteasome system in the hypothalamus of obese male mice. Endocrinology. 2014 doi: 10.1210/en.2014-1090.

7. Dias CB, Milanski M, **Portovedo** M, Horita V, Ayrizono Mde L, Planell N, Coy CS, Velloso LA, Meirelles LR, Leal RF. Defective apoptosis in intestinal and mesenteric adipose tissue of Crohn's disease patients. PLoS One. 2014 Jun. doi: 10.1371/journal.pone.0098547. eCollection 2014.
8. Leal RF, Milanski M, Ayrizono Mde L, Coope A, Rodrigues VS, **Portovedo** M, Oliveira LM, Fagundes JJ, Coy CS, Velloso LA. Toll-like receptor 4, F4/80 and pro-inflammatory cytokines in intestinal and mesenteric fat tissue of Crohn's disease. Int J Clin Exp Med. 2013.

Anexo C – Prêmio

2016 – Prêmio na sessão “Basic Science Poster Competition”. Título do trabalho: Effects of short-term high fat feeding on chaperone mediated autophagy proteins in hypothalamus of mice. *Obesity Society - Obesity Week Basic Science Section.*

Anexo D – Financiamento

Este projeto foi financiado pelo projeto 2013/10911-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).