



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LUÍSA DE OLIVEIRA SCHMITT

**ÁCIDO PALMÍTICO MODULA A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E
VIABILIDADE EM LINHAGEM CELULAR DE ASTRÓCITOS**

Florianópolis
2024

LUÍSA DE OLIVEIRA SCHMITT

**ÁCIDO PALMÍTICO MODULA A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E
VIABILIDADE EM LINHAGEM CELULAR DE ASTRÓCITOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da Universidade Federal
de Santa Catarina como requisito para obtenção do
Grau de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Prof. Dra. Joana Margarida Gaspar

Florianópolis
2024

Schmitt, Luísa de Oliveira

ÁCIDO PALMÍTICO MODULA A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E
VIABILIDADE EM LINHAGEM CELULAR DE ASTRÓCITOS / Luísa de
Oliveira Schmitt ; orientadora, Joana Margarida Navalho
Gaspar, 2024.

71 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Astrócitos. 3. Mitocôndria. 4. Ácidos
graxos saturados. 5. Neuroinflamação. I. Gaspar, Joana
Margarida Navalho. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III.
Título.

Luísa de Oliveira Schmitt

**ÁCIDO PALMÍTICO MODULA A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E
VIABILIDADE EM LINHAGEM CELULAR DE ASTRÓCITOS**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 21 de março de 2024,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

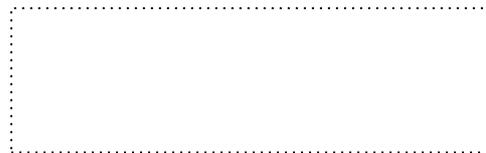
Profa. Dra. Dirleise Colle
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcelo Farina
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Mestra em Bioquímica



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Profa. Dra. Joana Margarida Navalho Gaspar
Orientadora

Florianópolis, 2024.

Dedico esta dissertação aos meus avôs, Jairo e Nelson, que apesar da baixa escolaridade sempre me apoiaram e me incentivaram a estudar.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora Professora Dra. Joana Gaspar, por toda a orientação e conhecimentos passados desde que iniciei a trabalhar e dar meus primeiros passos na pesquisa laboratorial, em meados de 2018, quando iniciei como sua aluna de iniciação científica.

Agradecer também à Professora Dra. Alexandra Latini, que desde 2018 me recebeu de braços abertos e me apoiou na pesquisa, junto com todos os membros de seu laboratório, LABOX, pela disponibilidade e auxílio na utilização de seus materiais e reagentes.

Agradeço aos Professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, em especial Professora Dra. Carla Tasca e Professor Dr. Rodrigo Leal, pela disponibilidade de utilizar sua sala de cultura para realização dos meus experimentos. Também, agradeço à Professora Dra. Manuella Kaster por me receber em seu laboratório, onde seus alunos me ensinaram muito sobre metodologias as quais eu não tinha muito aprofundamento.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), por toda a ajuda e auxílio na realização dos experimentos, que sem seus equipamentos seria praticamente impossível realizar este trabalho.

Agradeço à todos os meus amigos da pós-graduação: Ana Carolina Andrade, Antonella Blanco, André Luiz Vieira, Bruna Pierone, Caibe Alves, Cláudia Bianco, Gianni Mancini, Isabele Haruna, Leonardo Viana, Luísa Cruz, Maria Eduarda Moreira, Nicole Gil, Nicolle Platt, Rodrigo Seeger e Sheila Lima; mas também, aos que conheci e convivi antes de iniciar a pós-graduação, quando era apenas aluna de iniciação científica: Bruna Turnes, Débora Scheffer, Jennyffer Ione, Leonardo Barros e Tuany Eichwald, todos egressos do Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Também agradeço à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa disponibilizada para realização do meu mestrado acadêmico. Junto disto, gostaria de agradecer à minha amiga de Graduação em Farmácia e agora colega de Pós-Graduação no Centro de Ciências Biológicas da UFSC Iara Zanella, que me incentivou a continuar na pesquisa mesmo com a remuneração baixa, principalmente quando se compara ao salário de farmacêutico comercial.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família por todo apoio, principalmente aos meus avôs Jairo Miguel de Oliveira e Nelson José Schmitt, que estudaram apenas até a quarta série do fundamental, mas trabalharam muito (como pequeno agricultor e pedreiro,

respectivamente) para os meus pais tivessem mais acessos e oportunidades e consequentemente, que eu tivesse mais oportunidade.

“Quand le mystère est trop impressionnant, on n’ose pas désobéir.” (Le Petit Prince).

RESUMO

O crescente aumento do excesso de peso, obesidade e doenças metabólicas associadas possuem como causa principal o aumento da ingestão de alimentos com elevados teores em gorduras saturadas e/ou carboidratos, juntamente ao aumento de comportamentos sedentários. O consumo de dietas hipercalóricas por si só induz ao processo inflamatório que pode estar associado à disfunção dos processos homeostáticos de regulação energética e metabólica e assim, contribuir para o desenvolvimento da obesidade e de doenças metabólicas. A obesidade é definida como acúmulo anormal de tecido adiposo e é caracterizada como um estado de inflamação crônica de baixo grau, que pode comprometer a função neuronal, estando associada a doenças neurodegenerativas, declínio cognitivo e demência. Na obesidade, ocorre aumento na circulação de ácidos graxos saturados livres (como o palmitato) vindos do consumo excessivo destes na dieta e também do aumento da lipólise do tecido adiposo em razão da resistência à insulina (comorbidade associada) e aumento de mediadores pró-inflamatórios circulantes, podendo alterar o metabolismo e função mitocondrial.

Os astrócitos são células essenciais para a manutenção da homeostasia do sistema nervoso central (SNC). A localização privilegiada dessas células na barreira hematoencefálica faz com que os astrócitos sejam potenciais alvos das elevadas concentrações de ácidos graxos em casos de obesidade. Vários estudos demonstram que o consumo de dietas hiperlipídicas e ácidos graxos saturados promovem disfunção mitocondrial no SNC, no entanto estes estudos tem focado sobretudo em células neuronais. Deste modo, a hipótese deste trabalho foi de que os ácidos graxos saturados induzem um estado pro-inflamatório causando alterações na função mitocondrial e estresse oxidativo, o que contribui para a alteração da função e viabilidade de astrócitos em um modelo *in vitro*. Para testar a nossa hipótese foi utilizado um modelo *in vitro* de uma linhagem celular de astrócito (células C6), que receberam tratamento com 200 μM de palmitato ou 200 μM de estearato durante 6 horas. Após as 6 horas, avaliamos a viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT e a morfologia dos astrócitos através de uma imunocitoquímica de fluorescência usando o marcador GFAP. Também, avaliamos a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias por RT-PCR. Para as avaliações mitocondriais, foi avaliado potencial de membrana mitocondrial por JC-1 e Mitotracker Deep Red, atividade enzimática dos complexos mitocondriais e expressão gênica de genes envolvidos na fisiologia mitocondrial. A respiração celular foi mensurada por respirometria de alta resolução. Para avaliação de estresse oxidativo utilizamos a sonda DCF-DA e ensaio de TBARS. Observamos que os tratamentos acima de 400 μM de palmitato durante 6 horas e 24 horas diminuíram a

viabilidade celular comparado ao controle, deste modo para os experimentos seguintes utilizamos os tratamentos com as concentrações de 200 μM de palmitato ou 200 μM de estearato, para ver o efeito do tratamento antes da diminuição da viabilidade. O tratamento com 200 μM de palmitato alterou a morfologia dos astrócitos, aumentou a expressão de marcadores pró-inflamatórios (IL-6 e TNF- α), diminuiu o potencial de membrana mitocondrial, diminuiu a atividade do complexo I mitocondrial, diminuiu a expressão gênica de mitofusina-2 e diminuiu a expressão gênica de citrato sintase, sugerindo uma disfunção mitocondrial. Entretanto não houve alteração no consumo de oxigênio mitocondrial, nem nos parâmetros de estresse oxidativo (DCF-DA e TBARS). O tratamento com estearato não causou alterações significativas em nenhum parâmetro avaliado. Em conclusão, o palmitato induz um processo inflamatório e prejudica função mitocondrial em modelo de cultura celular de astrócitos, levando a mudança de morfologia e diminuição da viabilidade nestas células.

Palavras-chave: Astrócitos, ácidos graxos saturados, obesidade, mitocôndria, neuroinflamação.

ABSTRACT

The main cause of the increase of excess weight, obesity and associated metabolic diseases is the increase in the food intake with high levels of saturated fats and/or carbohydrates, associated with an increase in sedentary behaviors. The consumption of high-calorie diets induces an inflammatory process that may be associated with the dysregulation of physiological processes of energy homeostasis and metabolic regulation and thus contribute to the development of obesity and metabolic diseases. Obesity is defined as abnormal accumulation of adipose tissue and is characterized as a state of chronic low-grade inflammation, that can compromise neuronal function. Obesity is associated with cognitive decline and dementia. In obesity occurs an increase in the circulating levels of saturated fatty acids, such as palmitate, and also an increase in the pro-inflammatory mediator's. The high levels of fatty acids in circulation results from the consumption of high fatty diets as well as the increases in adipose tissue lipolysis (resulted from insulin resistance, an associated comorbidity). The high levels of saturated fatty acids and pro-inflammatory mediators can change the metabolism and mitochondrial function, compromising mitochondrial redox balance.

Astrocytes are essential cells for maintaining homeostasis in the central nervous system, contributing to neuronal functioning. The privileged location of these cells in the blood-brain barrier makes astrocytes potential targets for high concentrations of fatty acids in cases of obesity. Several studies demonstrate that the consumption of high-fat diets and saturated fatty acids promote mitochondrial dysfunction in the CNS, The hypothesis of this work was that saturated fatty acids cause induces an inflammatory process that can change mitochondrial function and increases in oxidative stress, leading to morphological changes and decreases in cellular viability in an *in vitro* model of astrocytes. A cell line culture of C6 (astrocytes) was used, which received treatment with 200 μ M palmitate or 200 μ M stearate for 6 hours. After 6 hours, we evaluated cell viability using the MTT assay and the astrocyte's morphology by immunocytochemistry using GFAP marker. We also evaluated the gene expression of cytokines by RT-PCR. For mitochondrial assessments, mitochondrial membrane potential was measured by the probes JC-1 and Mitotracker deep Red, enzymatic activity of mitochondria's complexes, gene expression of proteins related to mitochondrial physiology. Mitochondrial respiration was evaluated by oximetry by high-resolution respirometry. DCF-DA and TBARS assay were used to determine oxidative stress. We observed that 6 hours and 24 hours of palmitate treatment above 400 μ M decreased cell viability. For the next experiments 200 μ M of palmitate or 200 μ M stearate were used to treat the cells to visualize their effect before the decrease in viability.

The treatment with 200 μ M palmitate for 6 hours altered astrocyte morphology, increased gene expression of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α), decreased mitochondrial membrane potential, decreased mitochondrial complex I activity, decreased gene expression of mitofusin-2 and citrate synthase, suggesting that palmitate induces mitochondrial dysfunction. However, there was no change in mitochondrial oxygen consumption, nor in the oxidative stress parameters. Stearate treatment for 6h did not cause significant changes in any parameter evaluated. In conclusion, palmitate induces inflammation and impairs mitochondrial function in astrocytes, leading to changes in morphology and decreased viability in these cells.

Keywords: Astrocytes, saturated fatty acids, obesity, mitochondria, neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Disfunção do tecido adiposo na obesidade.....	23
Figura 2 – Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa.....	28
Figura 3 - Fisiologia mitocondrial.....	30
Figura 4 - Obesidade, disfunção mitocondrial e neuroinflamação	34
Figura 5 - Desenho experimental	39
Figura 6 - Esquema do consumo de oxigênio em um sistema celular de oximetria clássica	45
Figura 7 - Viabilidade celular dos astrócitos tratados com palmitato e estearato	48
Figura 8 - Morfologia astrocitária após o tratamento com palmitato e estearato	49
Figura 9 - Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias após o tratamento com ácido graxo saturado em astrócitos.....	50
Figura 10 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	51
Figura 11 - Expressão gênica de proteínas envolvidas na fisiologia da mitocôndria	53
Figura 12 - Atividade enzimática dos complexos mitocondriais	54
Figura 13 – Respirometria de astrócitos tratados com palmitato	55
Figura 14 - Avaliação de estresse oxidativo.....	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Primers utilizados	41
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP	Peptídeo relacionado à proteína Agouti
AP-1	Proteína ativadora 1
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Gás carbônico
DA	Doença de Alzheimer
DCF	Diclorofluorescína
DCF-DA	Diacetato de diclorofluorescína
DCIP	2,6-dicloindofenol
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Drp1	Proteína relacionada à dinamina-1
EROs	Espécies reativas do oxigênio
Est	Estearato
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina-adenina
FCCP	Carbonilcianeto4-trifluorometoxi fenil-hidroxona
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	Interleucina
IL-1-β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de massa corporal
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro- 1,1,3,3'
tetraetilbenzimidazolilcarbocianina	
Mff	Fator de fissão mitocondrial
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
ml	mililitro
mM	milimolar
mPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
MTT	Brometo 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nM	nanômetros
NO	Óxido nítrico
OPA-1	Proteína atrofica óptica 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Palmitato
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PINK1	Quinase 1 induzida por PTEN
PGC-1α	Co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
POMC	Pró-opiomelanocortina
QH2	Ubiquinol

RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
ROX	Consumo de oxigênio extramitocondrial
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
SUS	Sistema único de saúde
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll-like</i>
TLR4	Receptor do tipo <i>Toll-like</i> 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UCP2	Proteína desacopladora 2
V	Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	OBESIDADE	21
1.2	INFLAMAÇÃO ASSOCIADA À OBESIDADE	22
1.3	OBESIDADE E ALTERAÇÕES COGNITIVAS	23
1.4	PASSAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS AO ENCÉFALO	25
1.5	OBESIDADE E NEUROINFLAMAÇÃO	25
1.6	MITOCONDRIA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL	27
1.7	DISFUNÇÃO MITOCÔNDRIAL NA OBESIDADE	30
2	JUSTIFICATIVA	35
3	HIPÓTESE	36
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5	METODOLOGIA	37
5.1	CULTURA CELULAR	37
5.1.1	Preparação dos ácidos graxos conjugados com albumina	37
5.1.2	Teste de triagem	37
5.2	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E MORFOLOGIA CELULAR	38
5.2.1	Ensaio de viabilidade celular	38
5.2.2	Avaliação morfologia celular	39
5.3	EXTRAÇÃO DO RNA E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qRT-PCR)	39
5.4	AVALIAÇÕES MITOCONDRIAIS	41
5.4.1	Avaliação potencial de membrana mitocondrial	41
5.4.2	Avaliação da atividade enzimática dos complexos mitocondriais	42
5.4.3	Determinação da atividade do complexo I mitocondrial	42
5.4.4	Determinação da atividade do complexo II mitocondrial	43
5.4.5	Determinação da atividade do complexo IV mitocondrial	43
5.4.6	Oximetria de alta resolução	43
5.5	AVALIAÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO	45
5.5.1	Sonda fluorescente DCF-DA	45
5.5.2	Determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	45
5.6	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	46
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
6	RESULTADOS	47
6.1	O PALMITATO DIMINUI A VIABILIDADE CELULAR DE ASTRÓCITOS E ALTERA A SUA MORFOLOGIA	47
6.2	O PALMITATO AUMENTA A EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM ASTRÓCITOS	49
6.3	O PALMITATO REDUZ O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM ASTRÓCITOS	50

6.4	O PALMITATO DIMINUI A EXPRESSÃO DE MITOFUSINA-2 E DE CITRATO SINTASE EM ASTRÓCITOS.....	52
6.5	O PALMITATO REDUZ A ATIVIDADE DO COMPLEXO I MITOCONDRIAL EM ASTRÓCITOS.....	54
6.6	PALMITATO NÃO ALTERA O CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL EM ASTRÓCITOS.....	55
6.7	O TRATAMENTO COM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS NÃO CAUSAM ESTRESSE OXIDATIVO EM ASTRÓCITOS.....	55
7	DISCUSSÃO	57
8	CONCLUSÃO.....	62
9	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

A obesidade é definida como acúmulo anormal e excessivo de gordura, resultante de um desequilíbrio energético entre calorias ingeridas e gastas, principalmente em razão do aumento do consumo de alimentos densos em energia (ricos em gordura e açúcar) e comportamentos do tipo sedentários (WHO, 2021).

O excesso de peso e a obesidade atingem atualmente dimensões epidêmicas globais, afetando quer países de elevado nível socioeconômico, mas também em proporções cada vez maiores países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. Em 2022, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que mais de 1 bilhão de pessoas estavam com obesidade no mundo, sendo 650 milhões de adultos, 340 milhões de adolescentes e 39 milhões de crianças (WHO, 2022). No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a prevalência de excesso de peso de adultos brasileiros em 2019 foi de 60,3 % e de obesidade foi de 25,9 % (IBGE, 2020).

O aumento significativo do número de pessoas com obesidade e com complicações associadas, sobretudo alterações metabólicas e outras doenças de curso crônico, reflete no impacto socioeconômico das famílias e do país, principalmente devido ao aumento de recursos destinados à saúde (DE OLIVEIRA; SANTOS; DA SILVA, 2015; GREGG; SHAW, 2017; SAKLAYEN, 2018). Portanto, é necessário compreender quer a biogênese quer o desenvolvimento da obesidade, de modo a criar estratégias de prevenção e tratamento eficazes, e conseqüentemente evitando as comorbidades associadas. A etiologia da obesidade é complexa, abrangendo uma interação entre fatores genéticos, epigenéticos, fisiológicos, comportamentais, ambientais, psicológicos, culturais, sociais, econômicos e até fatores políticos (ARONNE; NELINSON; LILLO, 2009). O excesso de peso e a obesidade em adultos são comumente avaliados usando a medida do perímetro da cintura (gordura visceral) e o índice de massa corporal (IMC), que é calculado dividindo o peso em quilogramas pela altura ao quadrado (em metros) (kg/m^2). Deste modo, um IMC igual ou superior a 25,0 é considerado excesso de peso, enquanto um IMC igual ou superior a 30,0 indica obesidade. Dentro da faixa de obesidade, um IMC de 30,0 a 34,9 é caracterizado como obesidade grau I; de 35,0 a 39,9 grau II; e acima ou igual a 40,0 grau III.

1.2 INFLAMAÇÃO ASSOCIADA À OBESIDADE

A ingestão excessiva de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares promove a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo, de modo que este consiga armazenar grandes quantidades de ácidos graxos (SUN et al., 2011). Para além da sua função de armazenar energia, o tecido adiposo também funciona como órgão endócrino, produzindo hormônios (como a leptina, e adiponectina) e adipocitocinas (SETHI; VIDAL-PUIG, 2007). As adipocitocinas funcionam como moléculas reguladoras do metabolismo, e possuindo ainda funções de regulação imunológicas (SETHI; VIDAL-PUIG, 2007). Estudos demonstram que a hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo (principalmente do tecido adiposo branco visceral) são responsáveis pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, caracterizando o estado de inflamação crônica de baixo grau encontrado em condições de obesidade (figura 1) (BLÜHER et al., 2005; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; HOTAMISLIGIL, 2017a). Foi demonstrado que no plasma de indivíduos com obesidade ocorre aumento de interleucina (IL)-6, aumento de Proteína C Reativa e diminuição de IL-10 (BLÜHER et al., 2005), relacionado à polarização dos macrófagos pró-inflamatórios (M1) no tecido adiposo (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). Este estado de inflamação crônica subclínica participa de forma importante na biogênese da resistência à insulina, conectando a obesidade às doenças crônicas e inflamatórias que comumente a acompanham (HOTAMISLIGIL, 2017a, 2017b; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

Figura 1 - Disfunção do tecido adiposo na obesidade

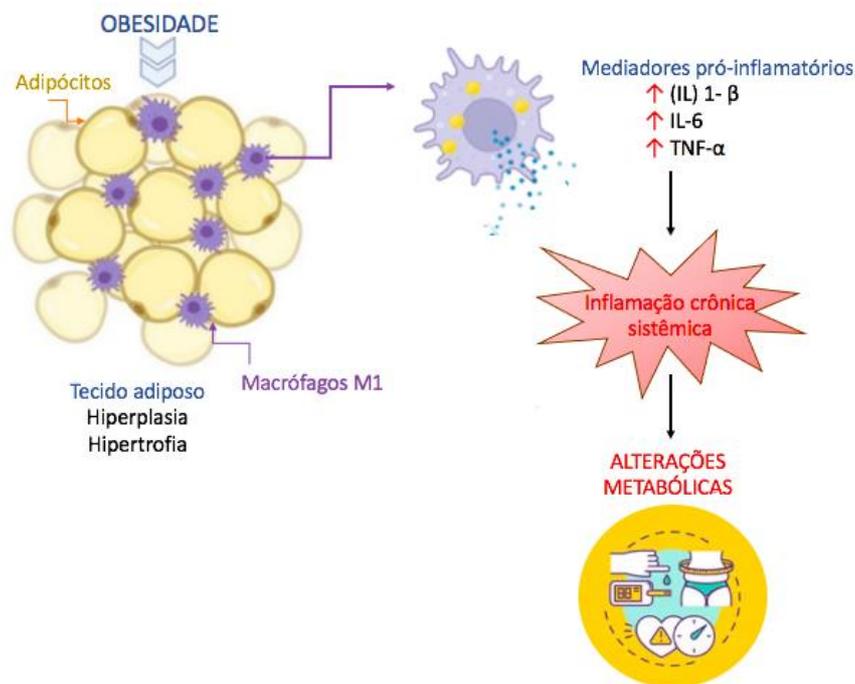


Figura 1. Aumento do número e do tamanho dos adipócitos no tecido adiposo branco desencadeiam inflamação sistêmica na obesidade. A obesidade causa hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo, bem como aumento do infiltrado de macrófagos M1 (pró-inflamatórios) no tecido adiposo branco, aumentando a secreção de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando em inflamação crônica sistêmica de baixo grau que contribui para alterações metabólicas (CRISPINO et al., 2020). Fonte: Da autora, (2024).

Os ácidos graxos saturados de cadeia longa mais encontrados nas dietas ocidentais são o palmitato e o estearato. O palmitato é um ácido graxo saturado de 16 carbonos encontrado principalmente em produtos de origem animal e em óleo de palma, enquanto o estearato possui 18 carbonos e é encontrado principalmente no cacau (CARTA et al., 2017). O palmitato é sintetizado endogenamente pelo corpo, porém, a partir do momento em que ocorre o aumento da ingestão de alimentos ricos em gordura, acarreta no aumento da concentração de palmitato circulante no plasma e também no cérebro (MELO et al., 2020). Ainda, o consumo crônico de gordura pode resultar em acúmulo de gordura do tecido adiposo, dislipidemias, hiperglicemia e acúmulo de gordura ectópica (CARTA et al., 2017).

1.3 OBESIDADE E ALTERAÇÕES COGNITIVAS

A obesidade, juntamente com o consumo de dietas ricas em gordura saturada e desenvolvimento de distúrbios metabólicos (como o *diabetes mellitus* tipo 2), são abundantemente reconhecidos como fatores de risco para o comprometimento da função e estrutura cerebral, para a disfunção de memória, deficits cognitivos, bem como para doenças

neurodegenerativas (SCHMITT; GASPAR, 2023). Estudos de ressonância magnética nuclear demonstraram atrofia encefálica e mudanças nas substâncias cinzenta e branca em pacientes com obesidade, oferecendo novas percepções entre a relação de obesidade e declínio cognitivo, a partir da perspectiva de imagem (GAZDZINSKI et al., 2009; HALTIA et al., 2007; WARD et al., 2005). Também, foi demonstrado que um IMC elevado está associado à diminuição de volume da massa cinzenta em várias áreas cerebrais, o que pode explicar os efeitos negativos no desempenho da memória (KHARABIAN MASOULEH et al., 2016). Indivíduos com obesidade também podem apresentar um início precoce da doença de Alzheimer, condição geralmente associada ao envelhecimento (GUSTAFSON et al., 2003). Um estudo de acompanhamento longitudinal de 18 anos revelou que mulheres idosas com excesso de peso possuem maior probabilidade de desenvolver doença de Alzheimer, entretanto não houve associação semelhante observada em homens (GUSTAFSON et al., 2003). Além disso, esse estudo demonstrou que o risco de desenvolver doença de Alzheimer aumenta em 36 % para cada aumento de 1,0 no valor do IMC (GUSTAFSON et al., 2003). Pacientes com IMC mais altos tendem a apresentar pontuações mais baixas em testes cognitivos e apresentam declínio longitudinal nas capacidades cognitivas (DAHL et al., 2009; WARD et al., 2005).

A ingestão elevada de gordura e açúcar está associada à prejuízos na aprendizagem e memória, particularmente no hipocampo, tanto em crianças quanto em adultos (ATTUQUAYEFIO et al., 2017; BAYM et al., 2014; FRANCIS; STEVENSON, 2011). A obesidade abdominal também está relacionada a um pior desempenho em funções executivas e atividades visomotoras, embora não afete necessariamente a memória verbal (WOLF et al., 2007). Adultos com sobrepeso e obesidade tendem a apresentar piores funções executivas quando comparados à adultos com peso normal, enquanto crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade estão associados à comportamentos que podem piorar a função cognitiva e o desempenho acadêmico (CSERJÉSI et al., 2007; LIANG et al., 2014; WOLF et al., 2007).

Modelos animais de obesidade induzida por dieta e com distúrbios metabólicos também apresentaram disfunção cognitiva e desempenho inferior das tarefas em comparação com animais controle (DE PAULA et al., 2021; LIZARBE et al., 2019; STRANAHAN et al., 2008). Ademais, estudos em modelos animais de roedores sugerem que altos níveis de glicose e de ácidos graxos saturados podem causar neuroinflamação, ativação da micróglia, disfunção mitocondrial, perda neuronal e prejuízo da plasticidade no hipocampo, hipotálamo e córtex destes animais (BEILHARZ; MANIAM; MORRIS, 2014; CARRARO et al., 2018; DALVI et al., 2017; GASPAR et al., 2010; HOWE et al., 2022; VALDEARCOS et al., 2014).

1.4 PASSAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS AO ENCÉFALO

A barreira hematoencefálica (BHE) permite a passagem por difusão simples dos ácidos graxos (DHOPESHWARKAR; MEAD, 1973), o que sugere que o aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos promove aumento da passagem dos mesmos para o cérebro. Mais especificamente, os ácidos graxos saturados conseguem ultrapassar a BHE por meio da ligação com proteínas plasmáticas, como a albumina (proteína pela qual os ácidos graxos saturados possuem bastante afinidade e particularidades de ligação) (AVELLINI; TERRACINA; GAITI, 1994). A albumina se liga aos ácidos graxos saturados com um número limitado de sítios de ligação, sendo demonstrado que ao aumentar a proporção ácidos graxos/albumina aumenta a constante de transferência cerebral (K_{in}), acarretando no aumento de absorção de palmitato pelo cérebro em modelo de ratos (utilizando técnica de perfusão *in situ*) (SMITH; NAGURA, 2001). Em indivíduos com obesidade, foi observado que ocorre aumento de ácido palmítico circulantes no líquido encéfalo raquidiano (cerca de 6 $\mu\text{g/ml}$), enquanto indivíduos com peso normal apresentam níveis menores de palmitato circulantes no líquido (cerca de 2 $\mu\text{g/ml}$) (MELO et al., 2020). Convertendo, isso seria aproximadamente 20 nM/ml de palmitato no líquido de indivíduos com obesidade. Também, foi demonstrado que o aumento na ingestão de dietas ricas em ácidos graxos saturados e colesterol diminuem a integridade da barreira hematoencefálica no hipocampo de ratos, alterando a homeostase da barreira e promovendo a ativação das células da glia (astrócitos e micróglia), o que sugere um processo neuroinflamatório (FREEMAN; GRANHOLM, 2012). A ativação das células da glia ainda é responsável por recrutar células do sistema imune periférico desencadeando o processo inflamatório (BALLAND; COWLEY, 2017; DOUGLASS; DORFMAN; THALER, 2017; GUPTA et al., 2012) .

Os astrócitos são células da neuróglia mais abundantes do sistema nervoso. Estas células desempenham funções de extrema importância para o normal funcionamento cerebral: sustentação e nutrição de neurônios; preenchimento de espaços entre os neurônios; regulação da concentração de substâncias extracelulares que podem interferir nas funções neuronais e ainda participam da estrutura da BHE, da imunidade e da manutenção da homeostasia cerebral (MELDOLESI, 2020). A localização privilegiada dos astrócitos na BHE e a sua capacidade de fornecer nutrientes aos neurônios faz com que os astrócitos sejam células alvo de extrema importância fisiológica para as ações das elevadas concentrações de ácidos graxos.

1.5 OBESIDADE E NEUROINFLAMAÇÃO

A obesidade é caracterizada por ser uma doença inflamatória de curso crônico de baixo grau, a qual aumenta a suscetibilidade às inúmeras condições associadas. Estudos relataram que

esta inflamação crônica sistêmica de baixo grau é responsável por causar alterações em estruturas cerebrais, nomeadamente cerebelo, amígdala, córtex cerebral e hipocampo (DE PAULA et al., 2021; DE SOUZA et al., 2005; THALER et al., 2012; YU et al., 2022). A inflamação relacionada à obesidade pode afetar a BHE, permitindo a entrada de leucócitos, patógenos e toxinas no sistema nervoso central (SNC), estimulando respostas inflamatórias contínuas (DE PAULA et al., 2021). A estrutura da BHE envolve proteínas de junção estreitas, como proteínas claudina, ocludina e moléculas de adesão juncionais. Em condições pró-inflamatórias, como na obesidade, a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) regula a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , aumentando esses mediadores circulantes, que por sua vez são capazes de perturbar a integridade da BHE (SALAS-VENEGAS et al., 2022). A perda da integridade da BHE durante a obesidade facilita a entrada destas citocinas pró-inflamatórias no parênquima cerebral, permitindo-lhes interagir e ativar as células gliais (astrócitos e micróglia), e deste modo, secretar mais citocinas pró-inflamatórias pela micróglia, perpetuando a neuroinflamação e ocasionando danos neuronais (SALAS-VENEGAS et al., 2022). Ademais, a obesidade induzida por dietas hiperlipídicas está associada ao aumento da entrada de células imunes periféricas no SNC e pode contribuir para a resposta inflamatória (BUCKMAN et al., 2014). A ingestão de ácidos graxos saturados induz a ativação do sistema imunológico inato via receptores *Toll-like* (TLRs), desencadeando a resposta inflamatória (HOWE et al., 2022). A ligação de ácidos graxos saturados ao TLR4 ativa NF- κ B e a proteína ativadora 1 (AP-1), que por sua vez regulam positivamente a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (ZHANG et al., 2009). Com base em estudos realizados em modelos animais de obesidade, foi proposto que os processos inflamatórios podem participar nos distúrbios periféricos e nos distúrbios cerebrais associados à obesidade, incluindo o desenvolvimento de alterações cognitivas (PUGAZHENTHI; QIN; REDDY, 2018), sendo que o início do processo inflamatório no cérebro, induzido por dietas ricas em gordura, é precoce e ocorre muito antes de existir uma condição de obesidade e inflamação periférica (no fígado, tecido adiposo ou músculo esquelético) (THALER et al., 2012; VALDEARCOS et al., 2014).

Nas diferentes regiões cerebrais de camundongos alimentados com dietas hiperlipídicas, para além do processo de neuroinflamação, o consumo de gorduras induz ao estresse do retículo endoplasmático (CAVADAS et al., 2016; DALVI et al., 2017; PURKAYASTHA et al., 2011) e disfunção mitocondrial (CAVALIERE et al., 2019; CHUNCHAI et al., 2016; DE PAULA et al., 2021; HORVATH et al., 2010; PALOMER et al., 2018; PARK; CHO; KIM, 2018; YI et al., 2017). Durante este processo inflamatório, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias

(IL-1 β , TNF- α , IL-6) que possuem efeitos nefastos na função cerebral, uma vez que o cérebro é extremamente sensível à presença destas citocinas. Deste modo, o processo inflamatório cerebral possui efeitos adversos para a homeostasia neuronal e conseqüentemente para os processos que regulam o metabolismo energético (consumo alimentar e gasto energético) e os processos cognitivos (DOUGLASS; DORFMAN; THALER, 2017).

O processo inflamatório aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), produzindo situações de estresse oxidativo. Conseqüentemente, o estresse oxidativo pode induzir alterações na função mitocondrial, que ajuda a aumentar a produção de EROs pela cadeia respiratória e que conseqüentemente aumenta o processo inflamatório (DE MELLO et al., 2018). A disfunção mitocondrial, em quase todos os tecidos, está envolvida na fisiopatologia da obesidade, incluindo a desregulação da homeostasia energética, e na resistência à insulina e o estado de inflamação crônica (DE MELLO et al., 2018; SCHMITT; GASPAR, 2023). A desregulação metabólica resultante da disfunção mitocondrial pode ser ainda um fator indutor das vias inflamatórias. Assim, a relação entre disfunção mitocondrial e inflamação pode ser considerado um círculo vicioso, isto porque o consumo excessivo de lipídeos promove aumento da produção de EROs, que conseqüentemente ativa mediadores inflamatórios como o NF-kB (DE MELLO et al., 2018; PALOMER et al., 2018).

1.6 MITOCONDRIA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL

A mitocôndria é a organela encarregada pela manutenção da homeostase energética, principalmente pela fosforilação oxidativa, responsável por gerar moléculas de ATP (HATEFI, 1985). Entretanto, também possui papel importante na regulação dos níveis de cálcio intracelular, regulação do sistema imune inato e regulação de morte celular programada (nomeadamente apoptose) (BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005; DELUCA; ENGSTROM, 1961; WEST; SHADEL; GHOSH, 2011). Em condições em que esta organela se torna disfuncional, ela não é capaz de gerar quantidades suficientes de energia, (ou seja, ATP) com intuito de manter a homeostasia dos diversos processos celulares, levando à oxidação de biomoléculas, incluindo aquelas relacionadas aos sistemas antioxidantes (SIES; CADENAS, 1985). Esse desequilíbrio na função da organela é capaz de predispor a morte de vários tipos celulares e contribuir para o sustento do estado pró-inflamatório.

A fosforilação oxidativa (figura 2) inicia com a entrada de elétrons derivados da oxidação de macronutrientes, utilizando transportadores na membrana externa e membrana interna mitocondriais. Os elétrons, em formato de NADH e FADH₂, são atraídos por centros redox localizados nos complexos proteicos mitocondriais I e II. A transferência subsequente de

elétrons continua através de outros centros redox denominados complexo III, citocromo *c* e complexo IV. À medida que os elétrons passam através dos complexos I/II ao IV até oxigênio molecular (aceptor final), ocorre a transferência de prótons através da membrana interna mitocondrial, resultando na formação do gradiente químico (ΔpH) e do gradiente elétrico ($\Delta\psi$) (NELSON; COX, 2019). A existência da segunda membrana mitocondrial assegura a produção do gradiente químico (energia potencial). Os prótons localizados no espaço intermembranar somente retornam para a matriz mitocondrial através de canais específicos conhecidos como canais F_0 (o: sensível a oligomicina) pois a membrana interna mitocondrial é impermeável. Ao passar por esses canais, os prótons impulsionam a síntese de energia pela proteína F_1 , fluindo passivamente de volta para a matriz mitocondrial. O complexo V, ou ATP-sintase, é constituído pelo canal F_0 e pela porção F_1 , sendo responsável pela síntese de ATP (NELSON; COX, 2019), ao mesmo tempo que bombeia os prótons para a matriz mitocondrial. A completa redução do oxigênio molecular para formar água metabólica é crucial para a síntese adequada de ATP.

Figura 2 – Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa

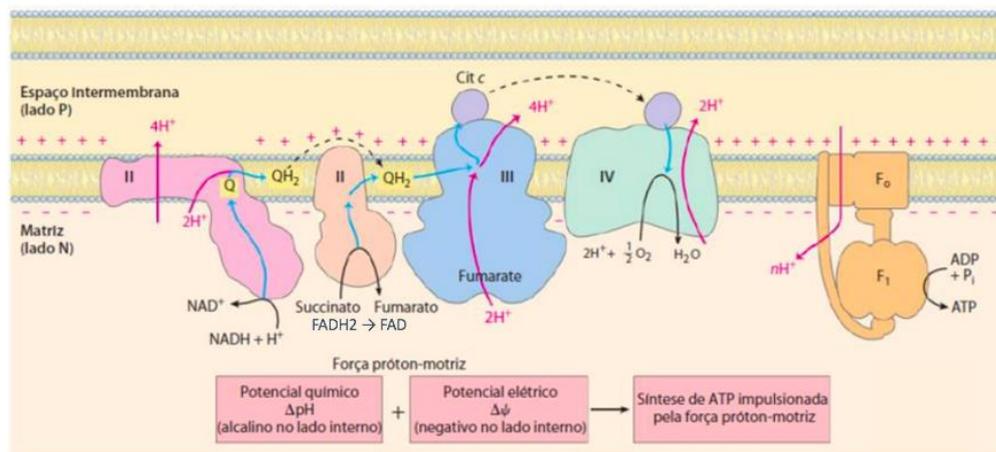


Figura 2. Fluxo de prótons e elétrons pelos complexos mitocondriais da cadeia respiratória na fosforilação oxidativa. Os elétrons originados de substratos energéticos são transportados por moléculas carreadoras de elétrons, como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Após receberem os elétrons, NAD e FAD são reduzidos em NADH e FADH₂, respectivamente. Posteriormente, os elétrons são atraídos pelos centros redox localizados nos complexos I e II. Em seguida, esses elétrons passarão pelo carreador de elétrons lipofílico coenzima Q (ubiquinona), resultando na redução da molécula em QH₂ (ubiquinol). Então, os elétrons são transportados de maneira seriada para o complexo III, citocromo *c* e complexo IV, até alcançar o oxigênio molecular (aceptor final de elétrons), resultando na completa redução do oxigênio em água metabólica. Concomitantemente, os complexos I, III e IV atuam como bombas de prótons e impulsionando os prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, gerando o gradiente elétrico que é convertido em energia química necessária para a síntese de ATP. A dissipação da energia química possibilita que a ATP-sintase forme e emancipe moléculas de ATP para a matriz mitocondrial (NELSON; COX, 2019). Fonte: (NELSON; COX, 2019)

As mitocôndrias estão envolvidas no ciclo contínuo de fissão e fusão, conhecido como dinâmica mitocondrial (KARBOWSKI; YOULE, 2003). O processo de fissão, ou divisão, é desencadeado pela contração do retículo endoplasmático, envolvendo receptores da membrana externa mitocondrial, como o fator de fissão mitocondrial (Mff). Esse fator recruta a proteína citosólica Drp1 (do inglês *dynamamin-related protein 1*) (FRIEDMAN et al., 2011), a qual é uma proteína mediadora da fissão, interagindo com receptores Mff na superfície da mitocôndria para formar oligômeros que dividem a mitocôndria em duas organelas distintas (STRACK; CRIBBS, 2012). A inibição da interação Mff-Drp1 resulta em disfunção na dinâmica mitocondrial, desencadeando estresse e morte celular (KORNFELD et al., 2018).

Por outro lado, a fusão da mitocôndria é mediada pelas proteínas mitofusina 1 e mitofusina 2 (Mfn1 e Mfn2, respectivamente) (CHEN et al., 2003). Essas proteínas facilitam as interações de fusão nas membranas externas mitocondriais de duas mitocôndrias, levando à junção de duas organelas (OKAMOTO; SHAW, 2005). Assim como na fissão, alterações no processo de fusão podem favorecer o desenvolvimento do estado citotóxico, comprometendo a homeostasia celular e ocasionando morte celular. Esses processos possuem atribuição essencial na manutenção da rede interconectada de mitocôndrias íntegras e funcionais, permitindo o compartilhamento de proteínas, substratos e DNA mitocondrial, bem como a segregação de regiões disfuncionais e danificadas dentro da mitocôndria (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012).

A mitofagia desempenha função crucial no controle de qualidade mitocondrial, envolvendo a degradação da organela e a reciclagem de aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos (NELSON; COX, 2019; ZHANG et al., 2007). Trata-se de um processo fisiológico que garante a eliminação de mitocondriais disfuncionais, preservando outras funções celulares. Todavia, alterações na mitofagia podem resultar no acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, desencadeando estresse oxidativo e inflamação, perpetuando assim a disfunção mitocondrial (WU et al., 2011). A fisiologia mitocondrial está representada na figura 3.

Figura 3 - Fisiologia mitocondrial

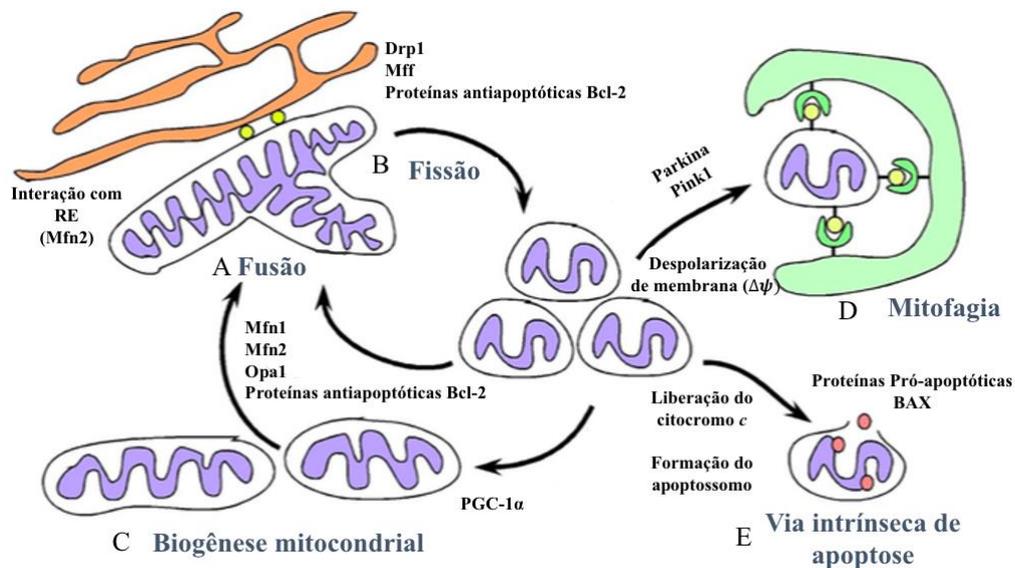


Figura 3. Fisiologia e dinâmica mitocondrial. A fusão mitocondrial é mediada pela ação de proteínas específicas, incluindo a proteína atrófica óptica 1 (OPA-1) na membrana mitocondrial interna e mitofusina 1 (Mfn1) e mitofusina 2 (Mfn2) na membrana mitocondrial externa, estimulando a fusão entre membranas mitocondriais adjacentes ao interagir com o retículo endoplasmático (RE) (A). A fissão mitocondrial é facilitada pela atividade GTPase da proteína relacionada à dinamina (Drp1), recrutada do citosol para as mitocôndrias em ocasiões de estresse, seguido da interação de Drp1 com fator de fissão mitocondrial (Mff) ocasionando na cisão das mitocôndrias em unidades menores (B). A biogênese mitocondrial é induzida pela escassez de nutrientes em resposta ao estresse oxidativo, sendo crucial para a homeostasia celular, estando envolvido o ativador de fator de transcrição co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α) (C). A mitofagia, forma especializada de macroautofagia, envolve degradação de mitocôndrias por meio da formação do autofagolisossomo, tendo proteínas envolvidas como Parkina e quinase 1 induzida por PTEN (PINK1) (D). A apoptose envolve a atividade de membros da superfamília de proteínas Bcl-2 (do inglês *B-cell lymphoma 2*), reguladores da morte celular, envolvendo a proteína pró-apoptótica X associada a Bcl-2 (BAX) e formação do apoptossomo (E) Fonte: Traduzido de (BOLAND; CHOURASIA; MACLEOD, 2013)

1.7 DISFUNÇÃO MITOCÔNDRIAL NA OBESIDADE

A obesidade e a *diabetes mellitus* do tipo 2 são fatores de risco para o desenvolvimento de disfunção cognitiva e demência. Estudos tem destacado e elucidado os mecanismos neurodegenerativos comuns observados nesses distúrbios, incluindo estresse oxidativo, inflamação e disfunção mitocondrial (WARDZINSKI et al., 2018). O consumo excessivo de nutrientes como ácidos graxos e glicose sobrecarregam as mitocôndrias, resultando no aumento da produção de acetil-CoA. Isso por sua vez estimula a produção do NADH pelo ciclo do ácido cítrico, impulsionando uma ampliação na cadeia de transferência de elétrons nas mitocôndrias e, conseqüentemente, aumenta a geração de EROs, podendo levar ao estresse oxidativo (WARDZINSKI et al., 2018). Além disso, há evidências de que o estado energético cerebral

diminui na obesidade, embora os mecanismos subjacentes não sejam completamente compreendidos. Estudos descobriram que pacientes com obesidade apresentam um declínio neuroenergético após o aumento experimental dos níveis de glicose plasmática (WARDZINSKI et al., 2018). Isso sugere que os cérebros de indivíduos com obesidade podem não ser capazes de gerar energia suficiente devido ao transporte disfuncional de glicose ou a uma síntese de energia insuficiente regulada pela respiração mitocondrial (WARDZINSKI et al., 2018)

Recentes evidências ressaltam o impacto sobre a função cerebral e os deficits cognitivos, demonstrando que o consumo a longo prazo de dieta hiperlipídica saturada induz prejuízos na função cerebral mitocondrial e na resistência cerebral à insulina (DAVIDSON et al., 2013; KRATZ; BAARS; GUYENET, 2013; YAN et al., 2014). Em modelo animal de obesidade em camundongos induzida por resistência à insulina, verificou-se que no cérebro desses animais ocorreu a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e apoptose (GALIZZI et al., 2021). No entanto, o tratamento com insulina foi capaz de melhorar essas disfunções. Também foi evidenciado o aumento do conteúdo de proteínas associadas à fissão e a ativação da mitofagia, indicando que alterações na via da insulina alteram a integridade mitocondrial e a mitofagia eficaz (GALIZZI et al., 2021). Em modelo murino de *diabetes mellitus tipo 1* (tratados com estreptozotocina) houve aumento significativo no consumo de oxigênio no estado IV da respiração mitocondrial (consumo de oxigênio ocasionado pela transferência de elétrons) no hipocampo, córtex e cerebelo (OSORIO-PAZ et al., 2018). Todavia, não foram observadas diferenças significativas nas atividades dos complexos mitocondriais, mas o potencial de membrana mitocondrial foi reduzido no hipocampo destes animais (OSORIO-PAZ et al., 2018).

Em modelos genéticos de ratos com obesidade e *diabetes mellitus tipo 2* (*Zucker Diabetic fatty rats*) foram observados aumento de EROs e da produção de óxido nítrico (NO no cérebro) (RAZA; JOHN; HOWARTH, 2015). Além disso, a atividade enzimática da catalase foi reduzida no cérebro desses animais. Em comparação com ratos de modelo magro, o metabolismo da glutathiona (molécula antioxidante) e as funções respiratórias mitocondriais foram negativamente afetados nos ratos *Zucker*. Mais especificamente, as atividades dos complexos I, II/III e IV, assim como o conteúdo de ATP mitocondrial diminuíram significativamente, indicando o desenvolvimento de complicações associadas à homeostase redox e à disfunção mitocondrial no cérebro (RAZA; JOHN; HOWARTH, 2015).

Ratos que receberam dieta rica em gordura apresentaram aumento da peroxidação lipídica, despolarização mitocondrial cerebral (avaliada por JC-1) e aumento do inchaço

mitocondrial no hipocampo destes animais, resultando em declínio cognitivo (CHUNCHAI et al., 2018; MA et al., 2014; PINTANA et al., 2013). Observou-se que a restrição energética combinada com vidalgliptina (inibidor da dipeptidil peptidase 4) restaurou a função mitocondrial e plasticidade sináptica no hipocampo juntamente com melhora da função cognitiva (CHUNCHAI et al., 2018; PINTANA et al., 2013). Além disso, a terapia de estimulação do nervo vago em ratos que receberam dieta hiperlipídica por 12 semanas resultou em melhoria da sensibilidade à insulina no cérebro, atenuação na disfunção mitocondrial induzida pela dieta e da apoptose celular, que conseqüentemente melhorou a função cognitiva (CHUNCHAI et al., 2016).

Em um estudo de camundongos que consumiram dieta hiperlipídica durante duas semanas, ocorreu alteração na atividade mitocondrial no hipocampo dos animais (avaliada por respirometria de alta resolução) (DE PAULA et al., 2021). Contudo, quatro semanas de consumo de dieta hiperlipídica induziu à diminuição do consumo de oxigênio e causou redução significativa na transferência de elétrons. Ainda, esses animais apresentaram comportamento tipo-depressivo e alteração na função da memória apenas cinco dias após o início do consumo da dieta hiperlipídica (DE PAULA et al., 2021).

Em camundongos submetidos à dieta obesogênica (elevado teor de gordura saturada e açúcar refinado) durante 12 semanas, foram observadas modificações nas proteínas citoesqueléticas, mitocôndriais e metabólicas no tecido cerebral (SIINO et al., 2021). Especificamente, as proteínas envolvidas nas funções mitocondriais foram reguladas negativamente nos ratos alimentados com a dieta obesogênica em comparação com ratos magros, sugerindo redução do metabolismo e menor atividade mitocondrial em ratos obesos (SIINO et al., 2021). Nos cérebros dos camundongos obesos, foi observada uma expressão gênica diminuída de nove proteínas envolvidas na atividade mitocondrial, incluindo as proteínas desidrogenases [ubiquinona] ferro-enxofre 4 e 5 (NDUFS4 e NDUFS5, respectivamente) e a subunidade 7B da citocromo c oxidase, mitocondrial (COX7) (componentes do complexo I e IV da cadeia respiratória) (SIINO et al., 2021).

No hipotálamo, a dinâmica mitocondrial regula a homeostase energética e o metabolismo (GÓMEZ-VALADÉS et al., 2021). No hipotálamo, a fusão mitocondrial regula o disparo neuronal através da modulação dos níveis intracelulares de ATP (CHIURAZZI et al., 2020). A deleção de Mfn2 nos neurônios anorexígenos pró-opiomielocortina (POMC) do hipotálamo interrompe o contato do retículo endoplasmático (RE) com a mitocôndria resulta em estresse do RE, resistência à leptina e ganho de peso (SCHNEEBERGER et al., 2013). No entanto, a deleção de Mfn2 em neurônios orexígenos peptídeos relacionados ao Agouti (Agrp)

induz ao menor ganho de peso em animais alimentados com dieta hiperlipídica (DIETRICH; LIU; HORVATH, 2013). O consumo de dieta hiperlipídica durante cinco semanas promoveu o aumento de Mfn2 no núcleo arqueado, mas após treze semanas de alimentação com esta dieta ocorreu a diminuição dessa proteína (DIAZ et al., 2015). Em modelo *in vitro* de células neuronais hipotalâmicas, os autores demonstraram que o palmitato diminuiu os níveis proteicos de Mfn2 e ativou o estresse do RE, exacerbando a resistência à insulina nas células neuronais hipotalâmicas (DIAZ et al., 2015).

Em comparação de uma cepa de camundongos resistentes à obesidade induzida por dieta (WSB/EiJ) com camundongos propensos à obesidade (C57BL/6J), foi possível averiguar que a cepa resistente à obesidade apresentou menor estado pró-inflamatório tanto periférico quanto centralmente (microglia menos ativa) e mitocôndrias mais responsivas no hipotálamo (TERRIEN et al., 2019). Na cepa resistente, ocorreu o aumento do conteúdo de ATP no hipotálamo após oito semanas de dieta hiperlipídica, indicando que a resposta inflamatória reduzida e aumento da atividade mitocondrial contribuem para a resistência à obesidade induzida pela dieta (TERRIEN et al., 2019). Entretanto, independente da linhagem, oito semanas de alimentação rica em gordura induziu à diminuição da área mitocondrial no hipotálamo (TERRIEN et al., 2019).

Todos estes processos fisiopatológicos, inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em conjunto contribuem para processos de disfunção celular e conseqüentemente, morte celular. Em vista disto, em condições de obesidade, o aumento de ácidos graxos livres circulantes podem chegar ao encéfalo acarretando em lipotoxicidade, afetando primeiramente os astrócitos (que suprem as necessidades dos neurônios), podendo ocasionar disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e aumentar o estado pró-inflamatório que culmina com reatividade nestas células. Em suma, todos esses mecanismos podem contribuir para a neurotoxicidade em condições de obesidade (figura 4).

Figura 4 - Obesidade, disfunção mitocondrial e neuroinflamação

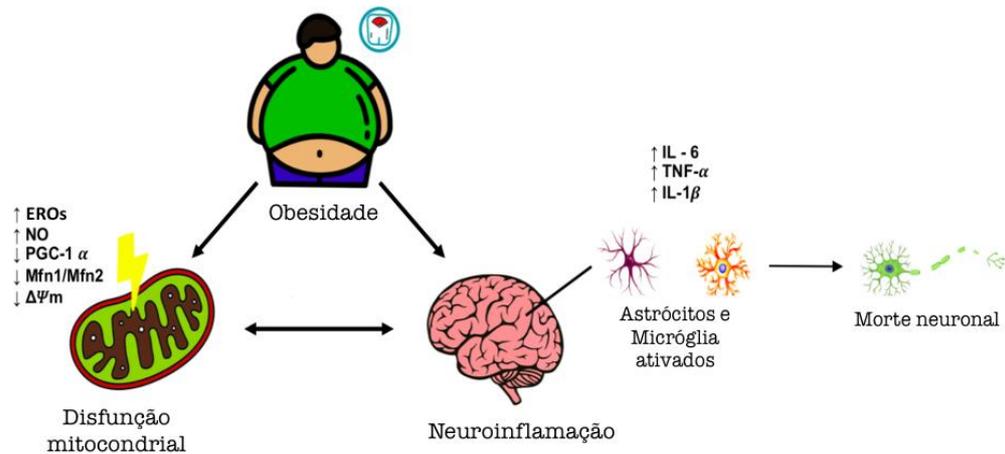


Figura 4. Obesidade está correlacionada à neuroinflamação e disfunção mitocondrial. O consumo em excesso de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares podem ocasionar disfunção mitocondrial indicada por aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs); aumento dos níveis de óxido nítrico (NO); diminuição no conteúdo proteico de PGC-1 α , Mfn1 e Mfn2; e diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$); além de estar relacionada ao aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios em regiões cerebrais, ocasionando neuroinflamação e reativação de células gliais devido à lipotoxicidade. Todos esses fatores comprometem a homeostasia e viabilidade das células neurais. Traduzido de (SCHMITT; GASPAR, 2023).

2 JUSTIFICATIVA

A obesidade é considerada pela OMS um problema de saúde pública global, a qual impacta na qualidade de vida da população. A obesidade é uma doença que não possui cura, sendo fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças de curso crônico não transmissíveis, como hipertensão arterial, *diabetes mellitus* do tipo 2, dislipidemias, doenças cardiorrespiratórias e câncer.

Em 2018, o Sistema único de Saúde (SUS) gastou cerca de R\$ 3,45 bilhões em razão de hospitalizações, procedimentos ambulatoriais e medicamentos para hipertensão arterial, diabetes e obesidade (NILSON et al., 2020). Deste modo, se torna um custo excessivo não só para o paciente, mas também para o Estado.

Ao longo dos últimos anos, várias pesquisas identificaram o consumo excessivo de ácidos graxos saturados como causa principal para o comprometimento da função neurológica. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos celulares e moleculares ainda não estão completamente elucidados. Assim, a identificação dos mecanismos moleculares associados às alterações cerebrais induzidas pelo aumento de ácidos graxos saturados circulantes pode contribuir para o conhecimento de potenciais alvos terapêuticos, permitindo atenuar a progressão da obesidade e doenças associadas.

3 HIPÓTESE

Os ácidos graxos saturados, nomeadamente o palmitato e o estearato, causam alterações na função mitocondrial, aumentam o estresse oxidativo, causam mudanças morfológicas e aumentam o estado pró-inflamatório em modelo *in vitro* de astrócitos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito dos ácidos graxos saturados (palmitato e estearato), na função mitocondrial, estresse oxidativo, morfologia e inflamação em cultura celular de linhagem de células C6 (capítulo 1).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o tempo e concentração de exposição dos astrócitos aos ácidos graxos saturados, de modo que foi escolhido a concentração e tempo que não culmine com diminuição da viabilidade celular.
- Avaliar o efeito dos ácidos graxos saturados na viabilidade e morfologia celular de astrócitos.
- Avaliar o efeito dos ácidos graxos saturados na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em astrócitos.
- Estudar o efeito dos ácidos graxos saturados na função e fisiologia mitocondrial em astrócitos.
- Verificar se os ácidos graxos saturados causam danos oxidativo em astrócitos.

5 METODOLOGIA

5.1 CULTURA CELULAR

Foi utilizado um modelo *in vitro* de cultura celular de astroglioma de rato (linhagem C6 – astrócitos) as quais foram cultivadas em estufa úmida com atmosfera contendo 5 % de CO₂ à 37 °C. As células foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com baixa glicose (5 mM), suplementado com 10 % (V / V) de soro fetal bovino (SFB) e 1 % (V / V) de penicilina-streptomicina (solução antibiótica-antimicótica). Após a confluência de mais de 90 % da garrafa de cultura, as células foram tratadas com 0,05 % (V / V) de tripsina em EDTA diluída 10X em tampão fosfato salino (PBS) estéril e semeadas em placas de cultura para as análises bioquímicas e moleculares. Para as análises, as células foram utilizadas durante a passagem 4 e a passagem 12 (P4 - P12).

5.1.1 Preparação dos ácidos graxos conjugados com albumina

A solução estoque de ácidos graxos saturados, palmitato e estearato (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) 10 mM foi preparada em água ultrapura. Ainda, foi preparada a solução estoque de BSA de 10 % em água ultrapura. A conjugação foi realizada incubando à 37 °C os ácidos graxos saturados com BSA numa proporção de 3:1, de acordo com a proporção fisiológica. Estas soluções foram utilizadas para tratar as células, sendo a solução de BSA na concentração final de 2,5 % usada como veículo para tratar as células controle. Deste modo, foram determinados quatro grupos experimentais: Controle (não tratados), veículo (tratados com BSA), palmitato (PA) e estearato (Est).

5.1.2 Teste de triagem

Após 24h do plaqueamento, as células foram tratadas inicialmente com ácido palmítico ou ácido esteárico conjugados com albumina sérica bovina (BSA), nas concentrações de 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM e 1 mM durante 6h com intuito de fazermos uma curva de dose-resposta da viabilidade por meio do ensaio de MTT, como método de triagem para a determinação da concentração de ácidos graxos saturados que foi utilizada. Em seguida, foi

realizado a curva da viabilidade por MTT das concentrações estabelecidas ao longo do tempo de 1h, 6h e 24h, para determinar o tempo de tratamento das células.

5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E MORFOLOGIA CELULAR

5.2.1 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT (Brometo 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), o qual se baseia na clivagem e redução deste composto por desidrogenases mitocondriais, produzindo o formazan que é um composto insolúvel em água e de coloração púrpura. As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 75.000 células / ml. Após a confluência as células foram tratadas com ácido palmítico e ácido esteárico, fazendo-se uma curva dose-resposta com diferentes concentrações (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M e 1 mM) durante 6h. Em seguida, foi realizado a avaliação de viabilidade celular ao longo de diferentes tempos de tratamento (1h, 6h e 24h) com a concentração que não alterou a viabilidade celular (200 μ M) e com a concentração que diminuiu a viabilidade celular (400 μ M), com intuito de verificar se as doses escolhidas afetam a viabilidade celular ao longo do tempo. Após esses tratamentos, as células foram incubadas com MTT (0,5 mg / ml) durante 1h a 37 °C. A detecção do formazan foi realizada por espectrofotometria a 540 nm na Multileitora Infinite M200 TECAN.

Para os próximos experimentos, as células foram plaqueadas e tratadas com palmitato ou estearato nas concentrações de 200 μ M no tempo de 6h, a qual não foi citotóxica, seguindo o desenho experimental (figura 5).

Figura 5 - Desenho experimental

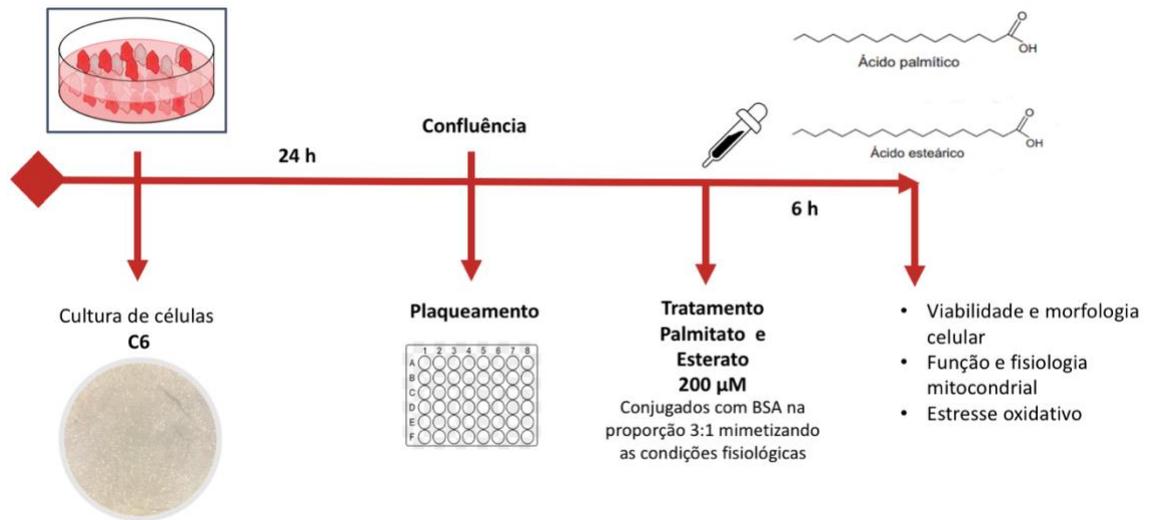


Figura 5. Protocolo experimental. As células C6 foram plaqueadas em placa de cultura e após a confluência foram contadas e semeadas em placa de 6, 12 ou 96 poços, dependendo da análise experimental. Após a confluência as células foram tratadas com 200 μ M de palmitato ou 200 μ M de estearato pelo período de 6 horas. Em seguida foram realizados os protocolos experimentais para avaliação da viabilidade, morfologia, função mitocondrial, fisiologia mitocondrial e estresse oxidativo nessas células. Para mimetizar as condições fisiológicas, o palmitato e o estearato foram conjugados com albumina sérica bovina (BSA) na proporção 3:1.

5.2.2 Avaliação morfologia celular

A morfologia celular foi avaliada por imunocitoquímica para o marcador celular de astrócitos GFAP. As células foram lavadas 2 x com PBS e fixadas à temperatura ambiente por 10 minutos com paraformaldeído 4 % contendo 4 % de sacarose. As células foram lavadas novamente 2 x com PBS e em seguida, permeabilizadas com Triton X-100 a 1 % em PBS* (PBS suplementado com 0,03 % de BSA) durante 10 minutos. Posteriormente as células foram bloqueadas durante 30 minutos com 10% soro de cavalo em PBS, em seguida incubadas com o anticorpo primário (GFAP, 1:500, Abcam #ab7260) por 2 horas em temperatura ambiente. As células foram lavadas 3 x com PBS* e incubadas no escuro durante 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com Alexa fluor[®] 488 (IgG anti-coelho, 1:500). A morfologia foi analisada através de coleta de imagens por microscopia de fluorescência usando o microscópio vertical Olympus BX41 e foram analisadas pelo programa image J[®].

5.3 EXTRAÇÃO DO RNA E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

O RNA total foi extraído de extratos celulares utilizando o reagente TRIzol (Sigma) de acordo com as recomendações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 2,0 μ g

de RNA total de acordo com as instruções do fabricante (Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade, Life Technologies). Cada PCR continha 25 ng de RNA transcrito reversamente, 0,25 µl de cada primer específico, master mix Taqman Universal (Life Technologies) e água livre de RNase até um volume final de 10 µl. A análise por PCR em tempo real da expressão gênica foi realizada em um sistema de detecção de sequência ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Os primers foram adquiridos da Applied Biosystems ou da Integrated DNA Technologies. Para o cálculo do RT-PCR utilizamos delta CT e a expressão gênica relativa foi normalizada para a expressão do GAPDH em todas as amostras. Os números do banco genético de todos os primers estão listados no quadro 1. Os dados em tempo real foram analisados usando o Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

Quadro 1 - Primers utilizados

Gene	Gene ID	Locus
GAPDH	14433	NM_001411840.1
Interleucina - 1 β (<i>Il-1 β</i>)	16176	NM_008361.4
Interleucina - 6 (<i>Il-6</i>)	16193	NM_031168.2
TNF- α	21926	NM_013693.3
Mitofusina -2 (<i>Mfn2</i>)	170731	NM_133201.3
Citrato sintase (<i>Cs</i>)	12974	NM_026444.4
Acetil-CoA Carboxilase (<i>Acaca</i>)	107476	NM_133360.3
OPA-1 (<i>Opa-1</i>)	74143	NM_133752.4
Beclina -1 (<i>Becn1</i>)	56208	NM_019584.4

5.4 AVALIAÇÕES MITOCONDRIAIS

5.4.1 Avaliação potencial de membrana mitocondrial

A medição do potencial de membrana mitocondrial foi avaliada pela sonda fluorescente MitotrackerTM deep red e pela sonda fluorescente JC-1.

Para a avaliação utilizando a sonda MitotrackerTM deep red, as células foram semeadas em placas de 12 poços na concentração de 75.000 células / ml e após a confluência foram tratadas com ácido palmítico ou ácido esteárico (200 μ M) durante 6h. Após o tratamento, as células foram lavadas em PBS e posteriormente incubadas com MitotrackerTM Deep Red (300 nM) por 15 min à temperatura ambiente, seguido de lavagem com PBS e fixação com paraformaldeído (3,7%) por 5 min. Posteriormente, os núcleos celulares foram marcados pelo marcador nuclear DAPI (5 μ g / ml) durante 5 minutos no escuro. Em seguida retirou-se o DAPI e as células foram lavadas em PBS, deixando no final 100 μ l de PBS para realizar as imagens no microscópio de fluorescência. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência usando o Microscópio Invertido Olympus IX 83 (mitotracker: excitação 620 nm, emissão 700 nm; DAPI: excitação 350 nm, emissão 460 nm). A fluorescência total do Mitotracker Deep red e o número total de núcleos por campo foram quantificados usando o

software image J[®] e o potencial de membrana mitocondrial foi expresso como fluorescência por núcleo.

Para medição do potencial de membrana mitocondrial usamos a sonda fluorescente JC-1 (Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro- 1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), um membro da família da carbocianina o qual sua banda-J fluorescente é sensível ao potencial de membrana, tendo coloração verde em baixos potenciais e vermelho-alaranjada em altos potenciais (REERS; SMITH; CHEN, 1991). As células (75.000 células / ml) foram semeadas em placas de 96 poços e após a confluência, tratadas com ácido palmítico e de ácido esteárico 200 µM durante 6h. Em seguida, retirou-se o meio e adicionou-se JC-1 (5 µg / mL) por 25 minutos incubando à 37°C. Posteriormente as células foram lavadas com PBS e no final colocou-se 100 µl de PBS para realização da leitura por espectrofotometria de fluorescência (Multileitora Infinite M200 TECAN) sendo excitação em 485 nm e 535 nm e; emissão em 530 nm e 590 nm respectivamente. Os resultados foram expressos fazendo a razão da fluorescência 590/530.

5.4.2 Avaliação da atividade enzimática dos complexos mitocondriais

Para a avaliação da atividade enzimática dos complexos mitocondriais as células foram semeadas em placas de 6 poços na concentração de 250.000 células / ml. Após o tratamento por 6 horas com os ácidos graxos saturados, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em tampão SETH (sacarose 250 mM; EDTA 2 mM; TRIS básico 10 mM; heparina 50 UI / ml; pH 7,4) na proporção 50 uL de tampão para cada 1.000.000 de células. Posteriormente, o homogeneizado de células foi centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante usado para as análises. As atividades enzimáticas foram expressas por quantidade proteica da amostra, utilizando o método de Lowry para determinação de proteínas totais, o qual usa a BSA como padrão.

5.4.3 Determinação da atividade do complexo I mitocondrial

A mensuração da atividade enzimática do complexo I mitocondrial (NADH desidrogenase) foi realizada através da redução do ferrocianeto de potássio, que depende do NADH em um comprimento de onda de 420 nm (CASSINA; RADI, 1996). O fundamento desse método se baseia na diminuição da absorbância em função da redução do ferrocianeto de potássio pela NADH desidrogenase. Amostras (contendo de 0,2 – 0,4 mg de proteínas) foram adicionadas ao meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,4), 80 µM de

rotenona e 500 μM de FeCN. A reação foi iniciada após a adição de 0,35 mM de NADH e avaliada pelo consumo do substrato (NADH) ao longo de 5 minutos por espectrofotometria, (Multileitora Infinite M200 TECAN). A atividade do complexo I foi calculada como nmol/min/mg de proteína.

5.4.4 Determinação da atividade do complexo II mitocondrial

Para a determinação da atividade do complexo II da cadeia respiratória, a diminuição da absorbância em função da redução do 2,6-dicloindofenol (DCIP) pela succinato desidrogenase a 600 nm foi medida conforme descrito por Fischer (FISCHER et al., 1985). As amostras foram incubadas por 20 min a 37 ° C em meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 62 mM (pH 7,4), succinato de sódio 9,2 mM e DCIP 5,0 μM . Após a incubação, foram adicionados 2,5 mM de azida de sódio e 40,0 μM de rotenona e, posteriormente, a reação foi iniciada pela adição de 25 μM de DCIP e monitorada por 5 min a 37 ° C por espectrofotometria (Multireader Infinite M200 TECAN). Os resultados foram expressos em nmol de DCIP reduzido em mg de proteína por minuto. Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 20,5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para DCIP. A atividade do complexo II foi calculada como nmol/min/mg de proteína.

5.4.5 Determinação da atividade do complexo IV mitocondrial

A mensuração da atividade enzimática do complexo IV mitocondrial (Citocromo c oxidase) foi realizada através da oxidação do citocromo c reduzido (RUSTIN et al., 1994) e calculada pela diminuição da absorbância causada pela diminuição da oxidação do citocromo c na absorbância de 550 nm, ao longo de 5 minutos por espectrofotometria (Multileitora Infinite M200 TECAN). Amostras (contendo de 0,2 – 0,4 mg de proteínas) foram adicionadas ao meio de reação contendo tampão Tris-HCl 200 mM (pH 7,4). Os resultados foram expressos em nmol de citocromo c reduzidos em mg de proteína por minuto. Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar do citocromo c de $19 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. A atividade do complexo IV foi calculada como nmol/min/mg de proteína.

5.4.6 Oximetria de alta resolução

Para determinar o consumo de oxigênio mitocondrial as células (grupo controle e grupo tratado com palmitato 200 μM , na concentração de 500.000 células / ml) foram ressuspensas

em meio DMEM baixa glicose livre de soro fetal bovino a 37 °C e colocadas no oxígrafo de alta resolução Oroboros 2K (Áustria) para avaliação dos seguintes parâmetros (figura 6):

1. Respiração basal: Consumo de oxigênio em condições basais. As células permaneceram nessas condições até a estabilização do consumo de oxigênio durante 10 minutos.
2. Estado IV da respiração mitocondrial: Avalia o consumo de oxigênio ocasionado pela transferência de elétrons através da cadeia respiratória. Nesse estado as células foram tratadas com oligomicina 1,2 μM (inibidor da enzima ATP sintase), ocasionando a depleção do consumo de oxigênio mitocondria l avaliada até sua completa estabilização durante 10 minutos.
3. Respiração máxima: Avalia a capacidade máxima mitocondrial de transferir elétrons. As células foram tratadas com o desacoplador mitocondrial FCCP (carbonilcianeto4-trifluorometoxi fenil-hidroxona), o qual foi titulado até a completa estabilização da respiração máxima durante 5 minutos, tendo a concentração final entre 2,5 μM e 4,0 μM de FCCP dependendo do dia experimental.
4. Consumo de oxigênio extramitocondrial (ROX): Avalia o consumo de oxigênio independente da respiração mitocondrial. As células foram tratadas com rotenona 0,5 μM (inibidor do complexo I mitocondrial) e antimicina A 2,4 μM (inibidor do complexo III mitocondrial). Deste modo, a cadeia respiratória é inibida resultando apenas no consumo de oxigênio residual.
5. Capacidade respiratória de reserva mitocondrial: Razão entre respiração máxima e estado IV (respiração máxima / estado IV) utilizado para determinar a capacidade de reserva mitocondrial.
6. Produção de ATP: Razão entre respiração basal e estado IV (respiração basal / estado IV) para estimar o consumo de oxigênio responsável pela produção de ATP.

Figura 6 - Esquema do consumo de oxigênio em um sistema celular de oximetria clássica

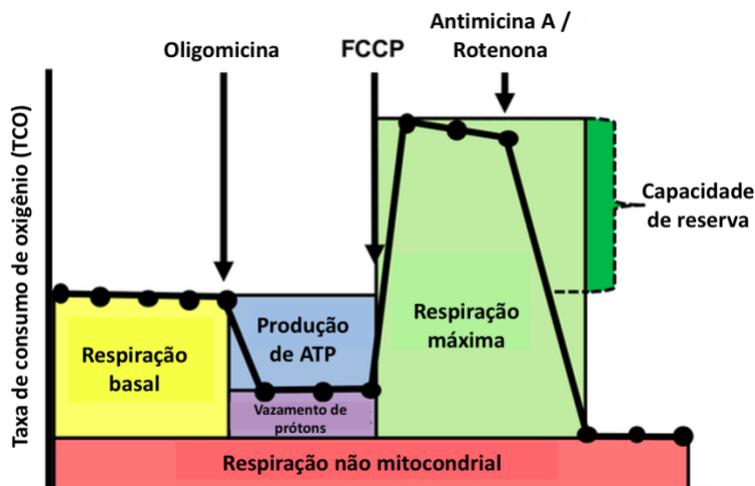


Figura 6. Taxa de consumo de oxigênio em respirometria clássica. Traduzido e adaptado de (NICHOLAS et al., 2017).

5.5 AVALIAÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO

5.5.1 Sonda fluorescente DCF-DA

A sonda fluorescente DCF-DA (diacetato de diclorofluorescína) é uma sonda que é oxidada por espécies reativas de oxigênio gerando o produto diclorofluorescína (DCF) fluorescente (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992). As células foram semeadas em placa de cultura de 96 poços na concentração de 75.000 células / ml e tratadas com BSA (veículo), palmitato 200 μ M e estearato 200 μ M. Após os tratamentos retirou-se o meio e lavou-se com PBS. As células então foram incubadas com DCF-DA 200 μ M diluídos em PBS durante 30 minutos. Após os 30 minutos retirou-se a sonda e colocou-se PBS para a leitura por fluorescência (Multileitora Infinite M200 TECAN) na excitação 488 nm e emissão 525 nm.

5.5.2 Determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para o ensaio de TBARS utilizamos o método de Yagi (YAGI, 1976). As células foram semeadas em placa de cultura de 12 poços na concentração de 250.000 células / ml e tratadas com BSA (veículo), palmitato 200 μ M e estearato 200 μ M. Após 6 horas de tratamento as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em tampão RIPA (150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,5 % deoxicolato de sódio; 0,1% SDS; 1% NP-40; 1 mM PMSF; 1

mM Na₃VO₄; 1 ul de coquetel de inibidores de protease comercial sigma®). As amostras foram tratadas com ácido tricloroacético (TCA) 10 % na proporção 1:1 e centrifugadas a 300 x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro sendo adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67 % seguido de vórtex e aquecimento em banho maria a 95 °C durante 1 hora. Para o resfriamento, as amostras foram colocadas em banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se n-butanol e as amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 5 minutos para extração da fase orgânica. Após a centrifugação transferiu-se 200 µL da fase orgânica (camada superior) para uma placa preta de 96 poços e leu-se a fluorescência (Multileitora Infinite M200 TECAN) na excitação 515 nm e emissão 553 nm.

5.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantidade de proteínas nas amostras foi mensurada pelo método de Lowry, que permite quantificar proteínas presentes na amostra a partir do reagente comercial Folin Ciocalteau (LOWRY et al., 1951).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise foi realizada através da utilização de métodos clássicos. Após a realização do teste de normalidade e a verificação de *outliers*, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), utilizando a comparação múltipla post-hoc de Dunett sempre que comparamos as várias doses ou tempos de ácidos graxos saturados com o controle. Dependendo dos grupos experimentais, foi utilizado a ANOVA de duas vias. Análise estatística não paramétrica foi utilizada quando os dados não apresentaram normalidade. Quando $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A análise estatística e os gráficos foram realizados com o programa Graph Pad Prism (versão Prism 9.0).

6 RESULTADOS

6.1 O PALMITATO DIMINUI A VIABILIDADE CELULAR DE ASTRÓCITOS E ALTERA A SUA MORFOLOGIA

O efeito dos ácidos graxos saturados na viabilidade celular de astrócitos foi avaliada através do ensaio de MTT. Foi realizada uma curva dose-resposta com várias concentrações (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M e 1 mM) de palmitato e estearato. Observamos que os tratamentos com as concentrações de 400 μ M (95% IC [-0,3252; -0,04705]; $p=0.0187$) e 1 mM de palmitato diminuiram significativamente a redução do MTT, indicando uma diminuição na viabilidade dos astrócitos (figura 7A). Em contrapartida, os tratamentos com diferentes concentrações de estearato não alteraram a viabilidade celular dos astrócitos (figura 7C).

Como as concentrações de palmitato abaixo de 400 μ M não afetaram a viabilidade, as concentrações de 200 μ M e 400 μ M foram escolhidas para avaliar o efeito da viabilidade celular ao longo do tempo, realizando-se a curva em 1 hora, 6 horas e 24 horas de tratamento. Ao longo de 24 horas, ocorreu redução na viabilidade celular no tratamento com palmitato tanto na concentração de 200 μ M (95% IC [0,1340; 0,6908]; $p=0.001$) quanto na concentração de 400 μ M (95% IC [0,1820; 0,7820]; $p \leq 0.001$) (figura 7B). O tratamento com estearato ao longo das 24 horas não alterou a viabilidade celular, indicando um efeito específico para o palmitato (figura 7D).

Devido ao fato da concentração de 200 μ M de palmitato não ter causado efeitos na viabilidade em 6 horas de tratamento, foi escolhido essa concentração e esse tempo para os tratamentos dos experimentos seguintes, tanto para palmitato quanto para estearato, com o intuito de avaliar os efeitos antes da diminuição da viabilidade nos astrócitos.

Figura 7 - Viabilidade celular dos astrócitos tratados com palmitato e estearato

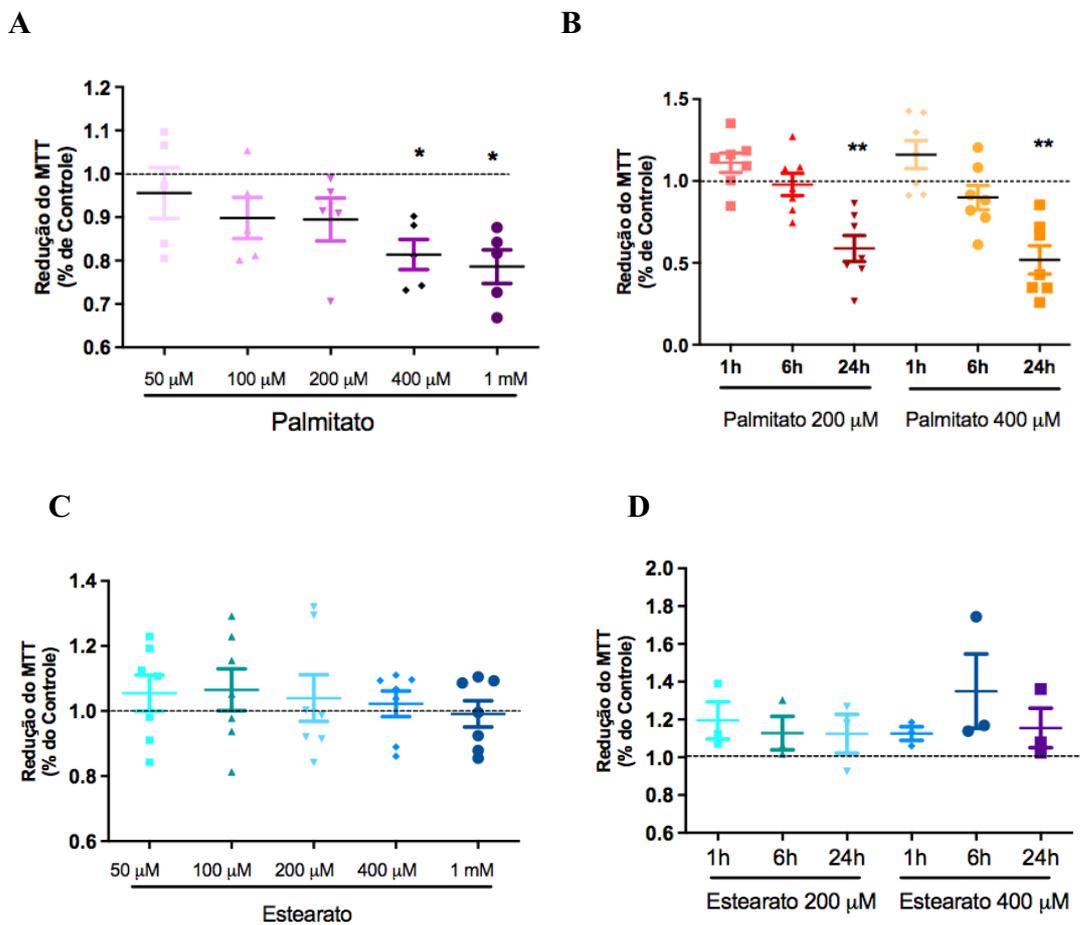


Figura 7. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT após o tratamento com ácidos graxos saturados. Viabilidade dos astrócitos após o tratamento com diferentes concentrações de palmitato durante 6 horas (A). Curva de tempo da viabilidade dos astrócitos após o tratamento com 200 μM e 400 μM de palmitato (B). Viabilidade dos astrócitos após o tratamento com diferentes concentrações de estearato durante 6 horas (C). Curva de tempo da viabilidade dos astrócitos após o tratamento com 200 μM e 400 μM de estearato (D). n = 4 – 7 *p ≤ 0,05 e ** p ≤ 0,01, comparando com o controle.

A avaliação da morfologia dos astrócitos foi realizada por imunocitoquímica de fluorescência, usando o marcador de astrócitos GFAP, e o marcador nuclear DAPI. Foi observado que o tratamento com palmitato 200 μM modificou a morfologia celular, a qual passou do fenótipo estrelado com características fibroblásticas para o formato arredondado (figura 8). Contudo, o tratamento com estearato 200 μM não alterou a morfologia dos astrócitos. Esses resultados sugerem que o tratamento com palmitato foi responsável pela reativação dos astrócitos em virtude da alteração no fenótipo celular.

Figura 8 - Morfologia astrocitária após o tratamento com palmitato e estearato

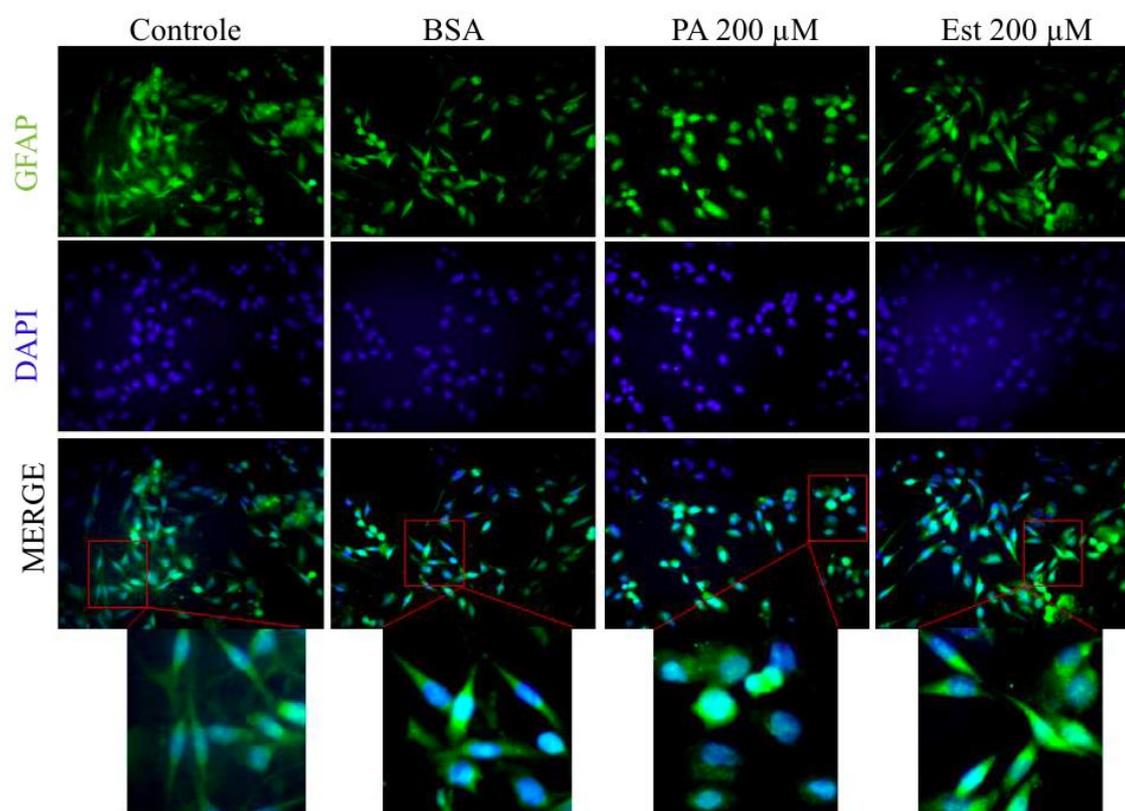


Figura 8. Morfologia dos astrócitos após tratamento com palmitato e estearato 200 μM. Imunofluorescência utilizando anticorpo GFAP (verde) após o tratamento com palmitato (PA) e estearato (Est) 200 μM durante 6 horas. DAPI (azul) foi usado como marcador nuclear. Representação de n = 3.

6.2 O PALMITATO AUMENTA A EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM ASTRÓCITOS

A avaliação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias foi realizada pela técnica de PCR. O tratamento com palmitato 200 μM durante 6 horas aumentou significativamente a expressão gênica de TNF- α (95% IC [-21.59; - 5.66]; $p = 0.0007$) e de IL-6 (95% IC [-14.14; -1.83]; $p = 0.0072$) (figura 9A e 9B), mas não alterou a expressão gênica de IL-1 β (figura 9C). Todavia, o tratamento com estearato não causou diferenças significativas na expressão gênica dessas citocinas. Esses resultados sugerem que o tratamento de curta duração com palmitato aumentou a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, indicando que o palmitato possui potencial pró-inflamatório.

Figura 9 - Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias após o tratamento com ácido graxo saturado em astrócitos.

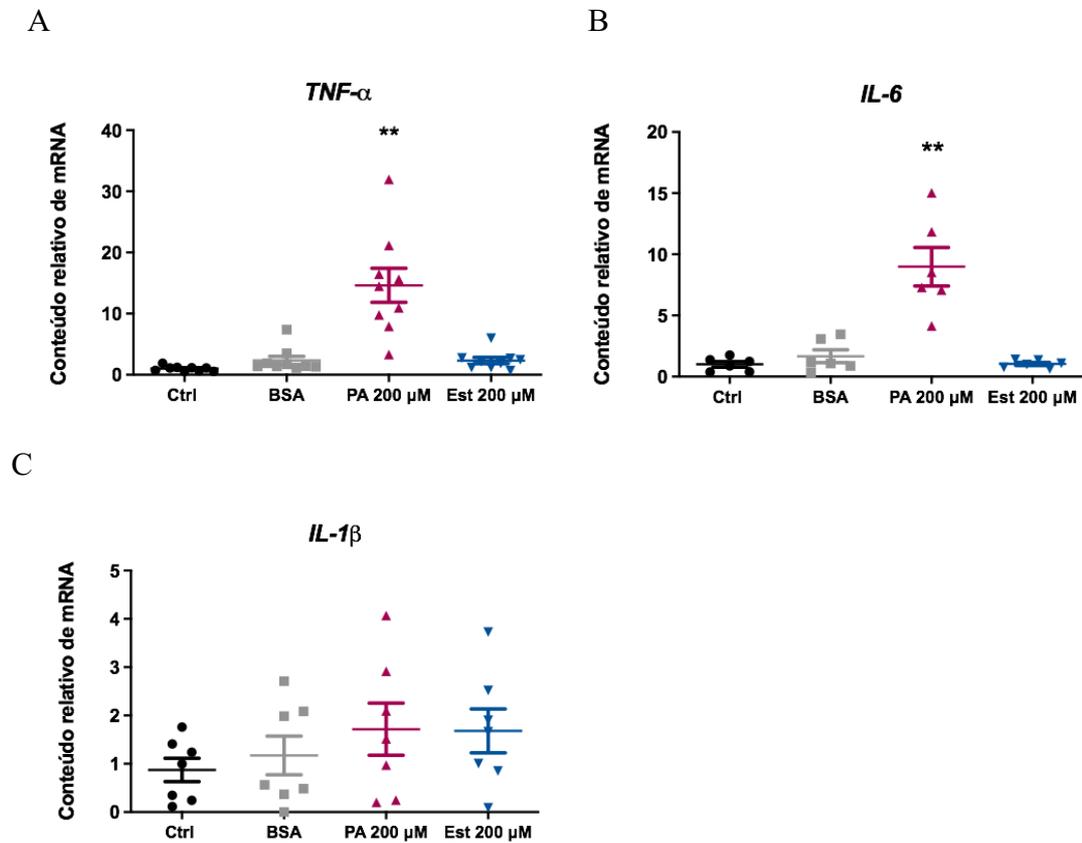


Figura 9. Efeito do tratamento com palmitato (PA) e estearato (Est) por 6 horas na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em astrócitos. Expressão gênica de TNF- α (A). Expressão gênica de IL-6 (B). Expressão gênica de IL-1 β (C). Os resultados foram padronizados pela quantificação da expressão gênica de GAPDH. n = 6 – 9. ** p \leq 0,01, comparando com o controle.

6.3 O PALMITATO REDUZ O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM ASTRÓCITOS

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado pelas sondas fluorescentes JC-1 e Mitotracker Deep Red. O tratamento de curta duração com palmitato 200 μ M por 6 horas diminuiu significativamente o potencial de membrana mitocondrial JC-1 (95% IC [0.04; 0.39]; $p = 0.0073$) e Mitotracker Deep Red (95% IC [0.00; 0.43]; $p = 0.0052$) (figura 10A, 10B e 10C). No entanto, o tratamento com estearato 200 μ M por 6 horas não alterou o potencial de membrana mitocondrial. Esses resultados indicam que o palmitato foi capaz de reduzir o potencial membrana mitocondrial, que é um parâmetro essencial para a manutenção da função fisiológica da cadeia respiratória, sendo sugestivo de disfunção mitocondrial.

Figura 10 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

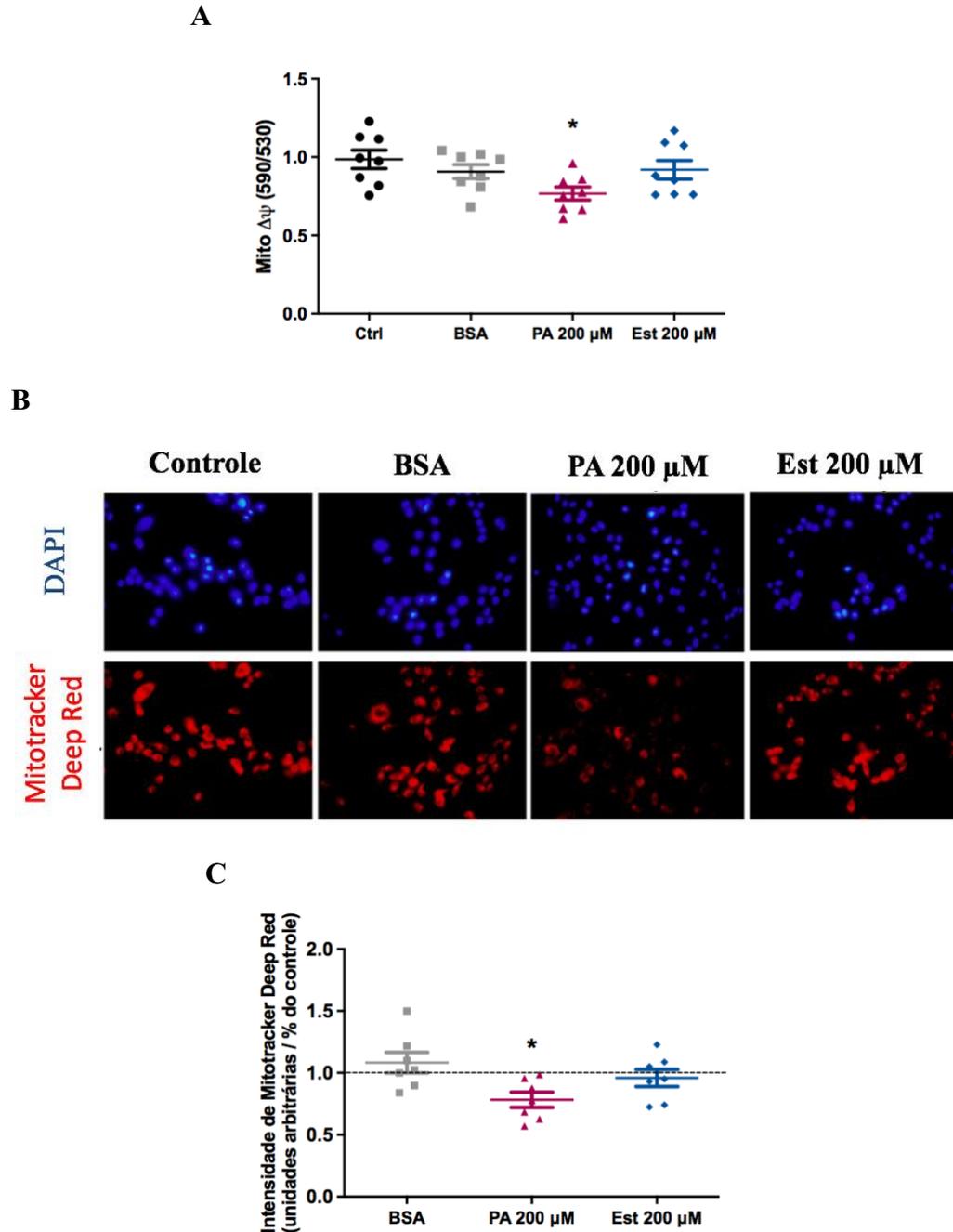


Figura 10. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial. Potencial de membrana mitocondrial por JC-1 na absorbância de emissão (530 nm e 590 nm) após o tratamento com 200 μ M de palmitato (PA) ou 200 μ M de estearato (Est) durante 6 horas (A). Potencial de membrana mitocondrial pelas sondas fluorescentes Mitotracker Deep red (vermelho) e DAPI (marcador nuclear azul) após os tratamentos com ácidos graxos saturados por 6 horas (B). Intensidade de fluorescência do Mitotracker Deep red após o tratamento com palmitato 200 μ M e estearato 200 μ M (C) durante 6 horas. n = 7 - 8 * $p \leq 0,05$ comparando com o controle.

6.4 O PALMITATO DIMINUI A EXPRESSÃO DE MITOFUSINA-2 E DE CITRATO SINTASE EM ASTRÓCITOS

Para avaliar alguns parâmetros da fisiologia mitocondrial, foi feita PCR de alguns genes envolvidos em processos fisiológicos mitocondriais, entre eles a dinâmica mitocondrial. Foi observado que o tratamento com palmitato 200 μM e estearato 200 μM durante 6 horas não alteraram a expressão gênica da beclina (figura 11A), a qual é uma proteína envolvida na macroautofagia, sendo indicativo de que a mitofagia não está alterada. Na avaliação da fusão mitocondrial, a expressão gênica da proteína OPA-1 (localizada na membrana interna mitocondrial) não foi alterada pelos tratamentos com palmitato 200 μM e estearato 200 μM (figura 11B). Porém, a expressão gênica da proteína transmembrana Mfn2 diminuiu significativamente após o tratamento com palmitato 200 μM por 6 horas (95% IC [0,01565; 0,3623] $p = 0,0104$), não ocorrendo alterações no tratamento com estearato (figura 11C). Deste modo, é sugestivo que o tratamento com palmitato 200 μM durante 6 horas está a comprometer o normal funcionamento da fusão mitocondrial.

A citrato sintase é uma enzima exclusivamente mitocondrial, utilizada como marcador de massa mitocondrial. Foi observado que o tratamento com palmitato 200 μM por 6 horas diminuiu a expressão gênica de citrato sintase (figura 11D), sugerindo que o palmitato promove uma diminuição da massa mitocondrial (95% IC [0,03065; 0,2801] $p = 0,0217$). Não foram encontradas diferenças na expressão gênica de citrato sintase após o tratamento com estearato. Estes resultados sugerem que o palmitato pode causar uma desregulação metabólica, já que a citrato sintase é uma enzima crucial para a manutenção do metabolismo.

Os tratamentos com palmitato e estearato não causaram mudanças na expressão gênica da enzima Acetil-CoA carboxilase, indicando que a síntese endógena de ácidos graxos não foi prejudicada (figura 11E).

Figura 11 - Expressão gênica de proteínas envolvidas na fisiologia da mitocôndria

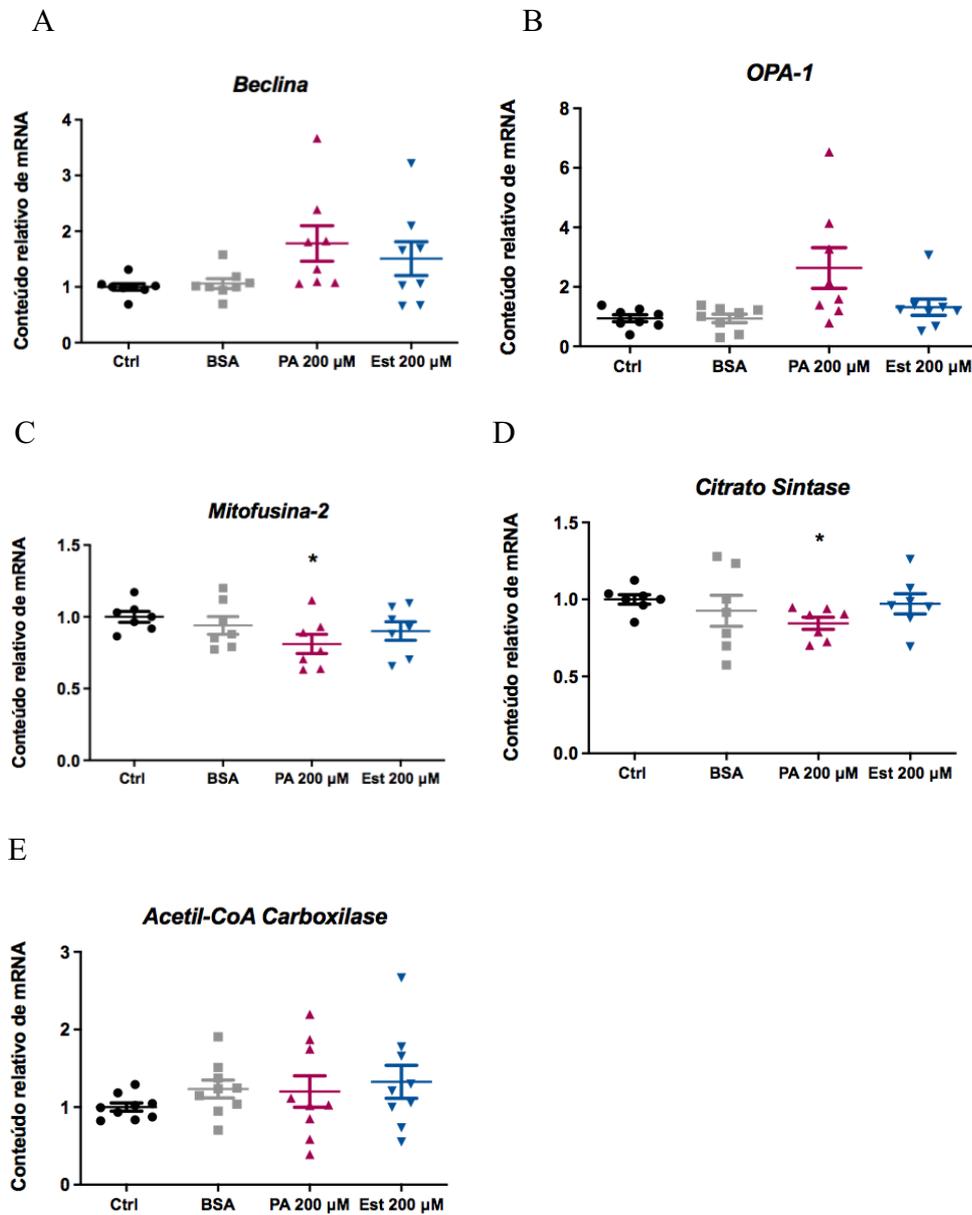


Figura 11. Expressão gênica de proteínas envolvidas na fisiologia mitocondrial. Expressão gênica de beclina em astrócitos tratados com palmitato (PA) e estearato (Est) durante 6 horas (A). Expressão gênica de OPA-1 em astrócitos tratados com palmitato e estearato durante 6 horas (B). Expressão gênica de Mitofusina-2 em astrócitos tratados com palmitato e estearato durante 6 horas (C). Expressão gênica de citrato sintase em astrócitos tratados com palmitato e estearato durante 6 horas (D). Expressão gênica de Acetil-CoA carboxilase em astrócitos tratados com palmitato e estearato durante 6 horas (E). Os resultados foram padronizados pela quantificação da expressão gênica de GAPDH. n = 6 – 9. *p ≤ 0,05 comparando com o controle.

6.5 O PALMITATO REDUZ A ATIVIDADE DO COMPLEXO I MITOCONDRIAL EM ASTRÓCITOS

As atividades dos complexos mitocondriais I, II e IV foram analisadas por espectrometria da atividade enzimática. Foi observado que o tratamento com palmitato durante 6 horas reduziu significativamente a atividade enzimática do complexo I mitocondrial, enzima NADH desidrogenase (95% IC [0,0166; 0,4900]; $p = 0.0452$) (figura 12A). No entanto o tratamento com palmitato 200 μM não alterou a atividade enzimática do complexo II (figura 12B) e do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial (figura 12C). Esse resultado sugere que a atividade da primeira enzima envolvida no transporte de elétrons da cadeia respiratória está prejudicada, podendo favorecer o desenvolvimento de alterações no potencial de membrana mitocondrial. Concomitante aos resultados anteriores, o tratamento com estearato não causou alterações significativas na atividade enzimática dos complexos mitocondriais em astrócitos.

Figura 12 - Atividade enzimática dos complexos mitocondriais

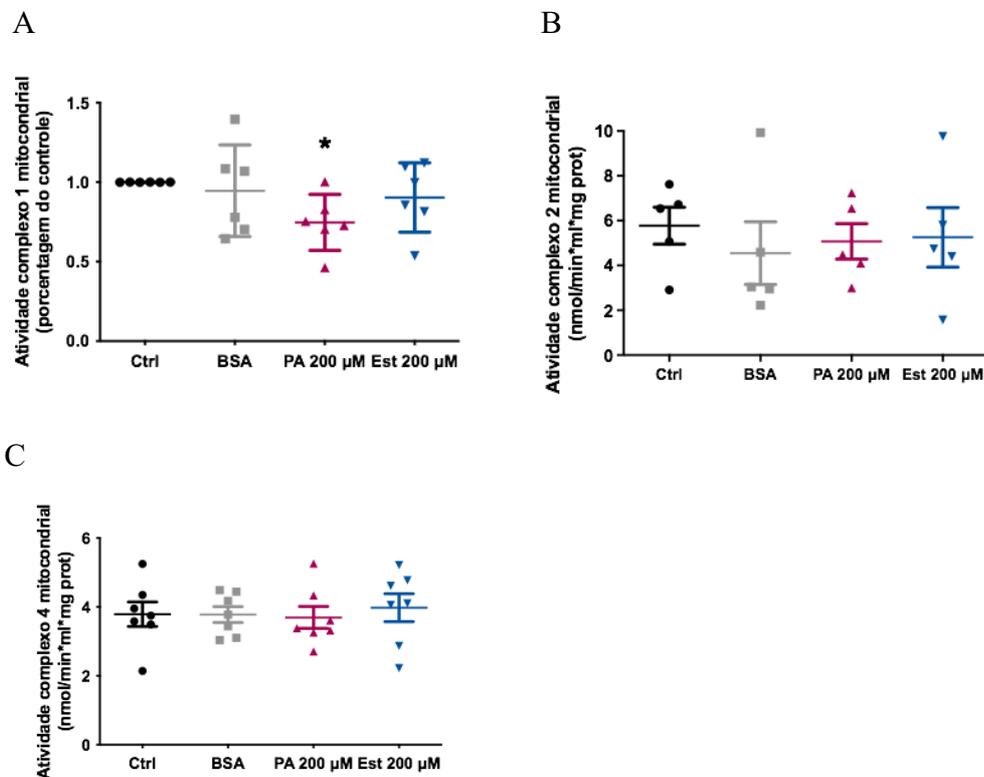


Figura 12. Atividade enzimática dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória mitocondrial. Atividade do complexo I mitocondrial em astrócitos tratados com palmitato (PA) e estearato (Est) durante 6 horas (A). Atividade do complexo II mitocondrial em astrócitos tratados com palmitato e estearato durante 6 horas (B). Atividade do

complexo IV mitocondrial em astrócitos tratados com palmitato e estearato durante 6 horas (C). n = 5-7. * $p \leq 0,05$ comparando com o controle.

6.6 PALMITATO NÃO ALTERA O CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL EM ASTRÓCITOS

O consumo de oxigênio mitocondrial foi avaliado pelo oxígrafo de alta resolução Oroboros 2K (Áustria). O tratamento com palmitato 200 μM não alterou o consumo de oxigênio na respiração basal, estado IV, respiração máxima, consumo de oxigênio extramitocondrial, capacidade de reserva mitocondrial e produção de ATP, sugerindo que a respiração mitocondrial não está comprometida (figura 13).

Figura 13 – Respirimetria de astrócitos tratados com palmitato

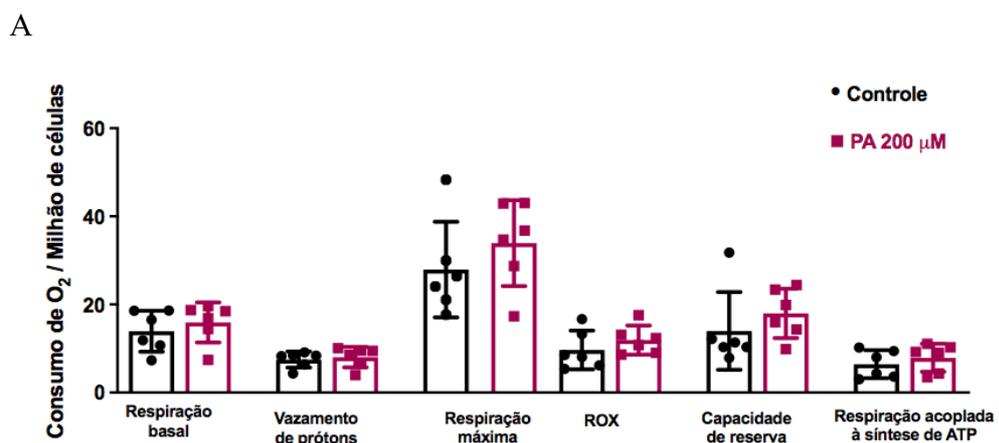


Figura 13. Consumo de oxigênio mitocondrial em astrócitos tratados com palmitato. Consumo de oxigênio por milhão de células nos parâmetros de respiração basal, vazamento de prótons, respiração máxima, respiração extramitocondrial (ROX), capacidade de reserva e respiração acoplada à síntese de ATP em astrócitos tratados com palmitato (PA). n = 6.

6.7 O TRATAMENTO COM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS NÃO CAUSAM ESTRESSE OXIDATIVO EM ASTRÓCITOS

O estresse oxidativo foi analisado pela sonda fluorescente DCF-DA e por ensaio de TBARS. Os tratamentos com palmitato 200 μM e estearato 200 μM não causaram alterações significativas na fluorescência de diclorofluorescína (DCF) (figura 14A) e nem nos níveis de

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (figura 14B) indicando que esses ácidos graxos saturados não alteram os níveis de espécies reativas de oxigênio e nem de peroxidação lipídica.

Figura 14 - Avaliação de estresse oxidativo

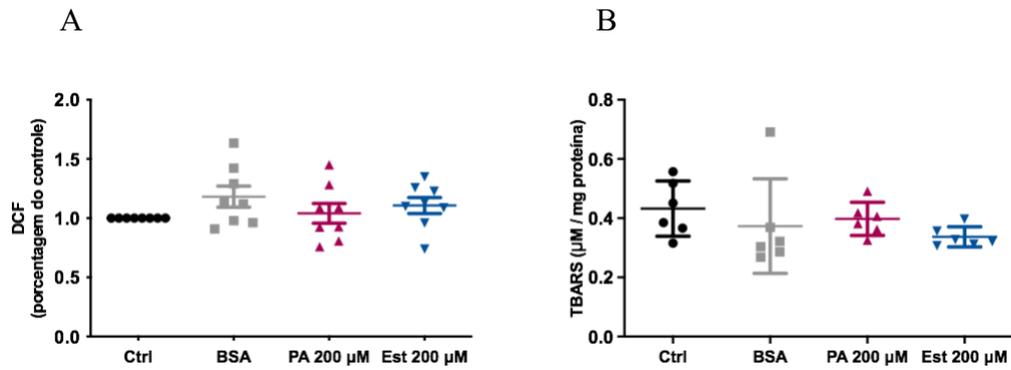


Figura 14. Avaliação de espécies reativas de oxigênio e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Níveis de Fluorescência de DCF em porcentagem do controle em astrócitos tratados com palmitato (PA) e estearato (Est) (A). Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em astrócitos tratados com palmitato (PA) e estearato (Est) (B). n = 6 - 8.

7 DISCUSSÃO

O palmitato e estearato são ácidos graxos saturados presentes nas dietas ricas em alimentos ultraprocessados denominadas “dietas de cafeterias”, que são dietas hipercalóricas (ricas em gorduras saturadas e açúcares refinados), porém pobres nutricionalmente. Alguns estudos vêm demonstrando que ácidos graxos saturados, como o palmitato e o estearato, atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) (BOURRE et al., 1978; PARDRIDGE; MIETUS, 1980). Aproximadamente 5 % do palmitato plasmático atravessa a BHE e chega ao cérebro de maneira unidirecional em uma única passagem (PARDRIDGE; MIETUS, 1980). Em indivíduos com obesidade, foi demonstrado que ocorre aumento de ácido palmítico circulantes no líquido cérebro raquidiano (cerca de 6 µg/ml), enquanto indivíduos com peso normal apresentam níveis menores de palmitato circulantes no líquor (cerca de 2 µg/ml) (MELO et al., 2020). Convertendo, isso seria aproximadamente 20 nM/ml de palmitato no líquor de indivíduos com obesidade. Todavia, as células do SNC possuem peculiaridades na capacidade de utilizar substratos no metabolismo oxidativo, sendo os astrócitos as principais células do SNC responsáveis por oxidar ácidos graxos (EDMOND et al., 1987).

Em nosso estudo, foi demonstrado que na linhagem celular de astrócitos (C6), que foi tratada a curto prazo com palmitato (C16:0), ocorreu uma diminuição da viabilidade celular, indicando que em condições de altas concentrações de palmitato, como em condições de obesidade, promove um efeito citotóxico. Resultados semelhantes foram encontrados em modelo *in vitro* de linhagem de astrócitos T98G, com redução na viabilidade celular após 48 horas de tratamento com concentrações de palmitato acima de 200 µM (NG; SAY, 2018). Ainda, evidências experimentais *in vitro* também sugerem que o tratamento com palmitato durante 24 horas reduz a viabilidade celular em astrócitos (GONZÁLEZ-GIRALDO et al., 2018; GUPTA et al., 2012; WANG et al., 2012). Porém, o tratamento com outros ácidos graxos saturados, como o ácido láurico (C12:0) e o ácido esteárico (C18:0), não promoveu alterações na viabilidade celular (GUPTA et al., 2012; NG; SAY, 2018), sugerindo um efeito específico do palmitato e corroborando com nossos resultados de que o estearato não causa mudanças na viabilidade celular. Por outro lado, astrócitos tratados com oleato (C18:1), um ácido graxo insaturado, tiveram a viabilidade celular aumentada, não acarretando no efeito gliotóxico (NG; SAY, 2018). Os ácidos graxos insaturados são aqueles que apresentam ligação dupla na sua cadeia carbônica. Tem sido observado que ao contrário dos saturados, o consumo de ácidos graxos insaturados possui efeitos benéficos, diminuindo do risco de desenvolvimento de déficit cognitivo (DYALL; MICHAEL-TITUS, 2008).

Em modelos animais submetidos a dietas hiperlipídicas saturadas, foi demonstrado que ocorre um aumento de células positivas para GFAP no hipotálamo, córtex e hipocampo desses animais, sugerindo um aumento de astrogliose, ou seja de reatividade dos astrócitos (DE ANDRADE et al., 2017; LIZARBE et al., 2019; ROBISON et al., 2020). Como nosso modelo celular é de tumor de linhagem astrocítica, essas células são positivas para GFAP (GALLAND et al., 2019) e a imunocitoquímica foi utilizada para avaliar mudanças na morfologia destas células. Estímulos que aumentam o conteúdo intracelular de AMP-cíclico (como a forskolina) desencadeiam na retração do corpo celular em C6 (GALLAND et al., 2019), sendo demonstrado que os tratamentos com 200 μM e 400 μM de palmitato aumentaram os níveis de AMP-cíclico intracelular em linhagem de células de hepatocarcinoma HepG2 (ZHANG et al., 2010). Corroborando, os nossos resultados mostraram também que o tratamento durante 6 horas com 200 μM de palmitato alterou a morfologia dos astrócitos, os quais se tornaram mais arredondados e com retração do corpo celular. Esses resultados corroboram com estudos em que o palmitato causa alterações na morfologia astrocitária, tornando eles redondos e espessos (GONZÁLEZ-GIRALDO et al., 2018) e também causando fragmentação nuclear (MARTIN-JIMÉNEZ et al., 2020).

Além da mudança da morfologia, outro fator importante para indicar a reatividade de astrócitos é o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Vários estudos vêm demonstrando que o tratamento com palmitato em astrócitos aumentam a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como o *TNF- α* , *IL-6* e *IL-1 β* (CHEN et al., 2018; GUPTA et al., 2012; ORTIZ-RODRIGUEZ et al., 2019; WANG et al., 2012), resultados também verificados em nosso estudo cujo tratamento de curto prazo com palmitato aumentou a expressão gênica de *TNF- α* e *IL-6*. Em conjunto, os resultados da mudança de morfologia e aumento da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias sugerem e corroboram com a literatura de que o tratamento de curto prazo com palmitato causa um processo inflamatório.

A disfunção mitocondrial é um dos mecanismos chave encontrado na fisiopatologia da obesidade (HEINONEN et al., 2015; PUTTI et al., 2015). Em modelos animais de obesidade, foi observado uma diminuição na síntese de ATP, o aumento de espécies reativas de oxigênio e ainda o inchaço mitocondrial no córtex desses animais (COREM et al., 2019; NUZZO et al., 2020; RAZA; JOHN; HOWARTH, 2015).

Em nosso trabalho, o fato do palmitato ter diminuído a viabilidade celular por meio do método de MTT, o qual se baseia na atividade enzimática de desidrogenases mitocondriais, foi um preditivo de que as mitocôndrias poderiam estar disfuncionais (BERRIDGE MV; TAN AS., 1993). O tratamento de curta duração com 200 μM de palmitato diminuiu o potencial de

membrana mitocondrial em astrócitos. Resultados muito similares foram encontrados por outros grupos de pesquisa, em que o tratamento de longo prazo (24 horas) com concentrações mais altas (1 mM e 2 mM) de palmitato diminuíram o potencial de membrana mitocondrial em astrócitos (GONZÁLEZ-GIRALDO et al., 2018; MARTIN-JIMÉNEZ et al., 2020). Ainda, González-Giraldo *et al.* (2018) verificaram que o palmitato diminuiu também a massa mitocondrial em astrócitos (GONZÁLEZ-GIRALDO et al., 2018).

Em camundongos tratados com 4 semanas de rica em lipídios saturados, ocorreu diminuição da respiração mitocondrial ligada ao complexo I no hipocampo desses animais (DE PAULA et al., 2021). No nosso trabalho, o palmitato diminuiu a atividade enzimática do complexo I mitocondrial, NADH desidrogenase. No entanto, não verificamos alterações significativas na atividade enzimática do complexo II e IV. Entretanto, em outro modelo celular, (macrófagos -células Thp-1), o tratamento de longo prazo (24 horas) com uma concentração maior (500 μ M) de palmitato, induziu uma diminuição da atividade do complexo II e IV (LI et al., 2018). Deste modo, podemos não ter evidenciado alterações nessas atividades enzimáticas pois os astrócitos foram tratados com uma concentração menor e por menos tempo.

Avaliamos o consumo de oxigênio mitocondrial por respirometria de alta resolução, e não obtivemos alteração na respiração nas células tratadas com palmitato. Em modelos *in vivo* tratados com dietas hiperlipídicas verifica-se uma diminuição da respiração mitocondrial no hipocampo dos animais (DE PAULA et al., 2021; MANCINI et al., 2021). Em culturas primárias de células endoteliais, foi observado que altas concentrações de palmitato (1,7 mM) e altas concentrações de glicose (5,5 mM) durante três dias induziram uma diminuição da respiração mitocondrial e um aumento de espécies reativas de oxigênio (HANSEN et al., 2021). Estudos demonstraram que o palmitato pode induzir ao desacoplamento mitocondrial dependente da presença da proteína desacopladora 2 (UCP2), que é responsável por controlar a dissipação de prótons através da membrana mitocondrial interna UCP2 (ANDREWS; DIANO; HORVATH, 2005; JOSEPH et al., 2002, 2004). Porém, em nosso estudo, os astrócitos tratados com palmitato não apresentaram mudanças nos diferentes estágios e parâmetros da respiração mitocondrial, novamente ressaltando que pode ter sido influenciado pelo pouco tempo de tratamento e concentração utilizada.

Vários estudos mostraram que em modelos animais de obesidade induzida por dietas hiperlipídicas alteram a homeostasia da dinâmica mitocondrial (fusão e fissão) em tecidos cerebrais (CARRARO et al., 2018; MANEECHOTE et al., 2022; YANG et al., 2021). Foi observado que ratos *wistar* expostos à dieta hiperlipídica durante 12 semanas tiveram mudanças no conteúdo de proteínas relacionadas à dinâmica mitocondrial em homogenato de hipocampo

e córtex, com um aumento do conteúdo proteico de Drp1, uma diminuição do o conteúdo proteico de Mfn2 e sem alterações na proteína OPA-1 (MANEECHOTE et al., 2022). Em concordância, esses resultados consolidam os nossos de que o palmitato diminuí a expressão gênica de *Mfn2*, porém a expressão do transcrito de *Opa-1* não tem alterações. Deste modo, dietas hiperlipídicas e altas concentrações de palmitato podem alterar a homeostasia da dinâmica mitocondrial (aumentando a fissão e diminuindo a fusão) em células cerebrais, podendo desencadear uma disfunção mitocondrial (MANEECHOTE et al., 2022). A citrato sintase é uma enzima localizada na matriz da mitocondria, utilizada para determinar massa mitocondrial. Em nosso estudo observamos que houve uma diminuição da expressão gênica de *citrato sintase*, sugerindo diminuição da massa mitocondrial, culminando com o achado de González-Giraldo *et al.* (2018) que palmitato diminuí a massa mitocondrial em astrócitos (GONZÁLEZ-GIRALDO et al., 2018).

A mitofagia é a remoção de mitocôndrias disfuncionais por meio da autofagia, a qual em mamíferos é precedida pela fissão mitocondrial (YOULE; NARENDRA, 2011). Em nosso estudo só avaliamos a expressão gênica de uma única proteína (*beclina*) envolvida na autofagia, não observando diferenças. Chen *et al.* (2018) investigaram que astrócitos tratados com 250 μ M de palmitato durante 12 horas aumentaram o conteúdo proteico de LC3B-II, proteína envolvida na formação do autofagossomo (CHEN et al., 2018). No mesmo estudo foi observado por microscopia eletrônica que o palmitato aumentou o número de vesículas autofagossômicas nos astrócitos (Chen et al., 2018). Com resultados semelhantes, Ortiz-Rodriguez *et al.* (2019) também demonstraram que o palmitato aumentou o conteúdo proteico de LC3B-II e p62 (proteína também envolvida na autofagia) nos astrócitos (ORTIZ-RODRIGUEZ et al., 2019). Porém, o palmitato diminuiu o fluxo autofágico, sugerindo supressão da autofagia e acúmulo das vesículas autofagossômicas sem sua completa degradação, culminando com morte celular por apoptose e necrose (ORTIZ-RODRIGUEZ et al., 2019).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas é superior à capacidade dos sistemas de defesa antioxidante atenuarem. Evidências da literatura mostram que o palmitato causa aumento de espécies reativas de oxigênio em astrócitos (CARTA et al., 2017; MARTIN-JIMÉNEZ et al., 2020; WANG et al., 2012). Apesar disso, no nosso estudo o tratamento com palmitato não causou aumento de EROs e corrobora com outro estudo em que o palmitato não induziu ao estresse oxidativo em astrócitos (GONZÁLEZ-GIRALDO et al., 2018). Também, não observamos aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, apesar de resultados da literatura verificarem aumento de TBARS em astrócitos tratados durante 24 horas com palmitato (NG; SAY, 2018).

Portanto, em condições de obesidade, os ácidos graxos saturados circulantes no plasma podem atravessar a BHE e afetar primeiramente os astrócitos, provocando desequilíbrio metabólico na função mitocondrial e impactando a viabilidade destas células, que conseqüentemente irá causar danos na homeostasia do SNC. Como seguimento desses eventos, as células responsáveis por nutrir e dar suporte aos neurônios estarão sob estresse, podendo desencadear em disfunção neuronal e contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

8 CONCLUSÃO

Com este trabalho, concluímos que o tratamento com 200 μM de palmitato a curto prazo causou disfunção mitocondrial em modelo *in vitro* de astrócitos por diminuir potencial de membrana mitocondrial, diminuir atividade enzimática do complexo I, diminuir expressão de proteínas envolvidas na fusão mitocôndrial e diminuir massa mitocondrial, gerando um desequilíbrio no metabolismo mitocondrial. Concluímos ainda, que o tratamento com palmitato induziu um aumento da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios e mudança de morfologia dos astrócitos, o que pode surgir a existência de uma astrogliose. Em virtude desses acontecimentos, a disfunção mitocondrial culmina com diminuição da viabilidade celular (Figura 15).

Contudo, as alterações no metabolismo mitocondrial podem gerar desequilíbrio metabólico no SNC, levando à disfunção celular em condições de obesidade e deste modo, favorecer o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Assim, nossa hipótese foi verificada levando em consideração que o palmitato induziu alterações na função mitocondrial, mudou a morfologia e contribuiu para o aumento do estado pró-inflamatório em astrócitos. Contudo, o estearato não causou alterações em nenhum dos parâmetros avaliados, indicando o efeito individual do palmitato.

Figura 15 - Palmitato compromete a função mitocondrial e viabilidade em astrócitos

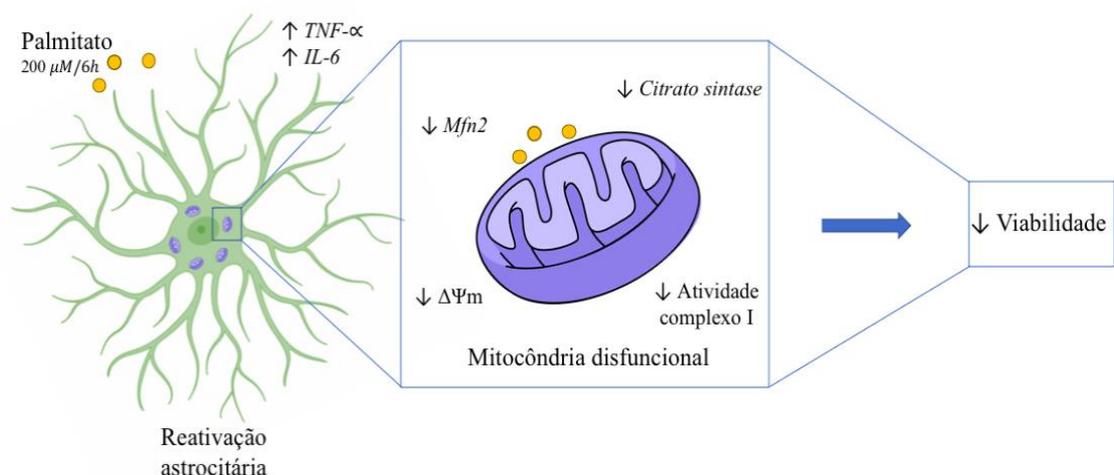


Figura 15. Palmitato causa disfunção mitocondrial culminando com diminuição da viabilidade em astrócitos. O tratamento com palmitato 200 μM durante 6 horas diminuiu a função mitocondrial, culminando com aumento da expressão gênica citocinas pró-inflamatórias e reativação astrocitária, que pode favorecer a diminuição da viabilidade nessas células.

9 REFERÊNCIAS

- ANDREWS, Z. B.; DIANO, S.; HORVATH, T. L. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: In support of function and survival. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 829–840, 2005.
- ARONNE, L. J.; NELINSON, D. S.; LILLO, J. L. Obesity as a disease state: A new paradigm for diagnosis and treatment. **Clinical Cornerstone**, v. 9, n. 4, p. 9–29, 2009.
- ATTUQUAYEFIO, T. et al. A four-day Western-style dietary intervention causes reductions in hippocampal-dependent learning and memory and interoceptive sensitivity. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–21, 2017.
- AVELLINI, L.; TERRACINA, L.; GAITI, A. Linoleic acid passage through the blood-brain barrier and a possible effect of age. **Neurochemical Research**, v. 19, n. 2, p. 129–133, 1994.
- BALLAND, E.; COWLEY, M. A. Short-term high-fat diet increases the presence of astrocytes in the hypothalamus of C57BL6 mice without altering leptin sensitivity. **J Neuroendocrinol**, v. 29, 2017.
- BAYM, C. L. et al. Dietary lipids are differentially associated with hippocampal-dependent relational memory in prepubescent children. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 5, p. 1026–1033, 2014.
- BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 37, p. 134–141, 2014.
- BERRIDGE MV; TAN AS. **Characterization of MTT Berridge 1992.pdf Archives of Biochemistry and Biophysics Biochem Biophys**, 1993.
- BLÜHER, M. et al. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 113, n. 9, p. 534–537, 2005.
- BOLAND, M. L.; CHOURASIA, A. H.; MACLEOD, K. F. Mitochondrial dysfunction in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 3 DEC, n. December, p. 1–28, 2013.
- BOURRE, J. M. et al. Is there a blood-brain relationship for saturated fatty acids during development? **Neonatology**, v. 34, n. 3–4, p. 182–186, 1978.

- BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying. **Biokhimiya**, v. 70, n. 2, p. 284–293, 2005.
- BUCKMAN, L. et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. **Brain Behav Immun.** **2**, v. 35, p. 1–21, 2014.
- CARRARO, R. S. et al. Hypothalamic mitochondrial abnormalities occur downstream of inflammation in diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 460, p. 238–245, 2018.
- CARTA, G. et al. Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. NOV, p. 1–14, 2017.
- CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 328, n. 2, p. 309–316, 1996.
- CAVADAS, C. et al. The pathophysiology of defective proteostasis in the hypothalamus - From obesity to ageing. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 12, p. 723–733, 2016.
- CAVALIERE, G. et al. High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. November, p. 1–13, 2019.
- CHEN, H. et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **Journal of Cell Biology**, v. 160, n. 2, p. 189–200, 2003.
- CHEN, Z. et al. The autophagic degradation of Cav-1 contributes to PA-induced apoptosis and inflammation of astrocytes. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 7, 2018.
- CHIURAZZI, M. et al. Mitochondrial dynamics and microglia as new targets in metabolism regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 1–14, 2020.
- CHUNCHAI, T. et al. Vagus Nerve Stimulation Exerts the Neuroprotective Effects in Obese-Insulin Resistant Rats, Leading to the Improvement of Cognitive Function. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–11, 2016.
- CHUNCHAI, T. et al. Decreased Microglial Activation Through Gut-brain Axis by Prebiotics, Probiotics, or Synbiotics Effectively Restored Cognitive Function in Obese-insulin Resistant Rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2018.
- COREM, N. et al. Leptin receptor deficiency induces early, transient and hyperglycaemia-independent blood-brain barrier dysfunction. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.
- CRISPINO, M. et al. Interplay between peripheral and central inflammation in obesity-promoted disorders: The impact on synaptic mitochondrial functions. **International Journal**

- of **Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–22, 2020.
- CSERJÉSI, R. et al. Is there any relationship between obesity and mental flexibility in children? **Appetite**, v. 49, n. 3, p. 675–678, 2007.
- DAHL, A. et al. Being overweight in midlife is associated with lower cognitive ability and steeper cognitive decline in late life. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 65, n. 1, p. 57–62, 2009.
- DALVI, P. S. et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: Effect of high-fat diet, palmitate and TNF- α on appetite-regulating NPY neurons. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 1, p. 149–158, 2017.
- DAVIDSON, T. L. et al. Inter-relationships among diet, obesity and hippocampal-dependent cognitive function. **Neuroscience**, v. 253, n. 202, p. 110–122, 2013.
- DE ANDRADE, A. M. et al. Omega-3 fatty acids revert high-fat diet-induced neuroinflammation but not recognition memory impairment in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 6, p. 1871–1881, 2017.
- DE MELLO, A. H. et al. Mitochondrial dysfunction in obesity. **Life Sciences**, v. 192, p. 26–32, 2018.
- DE OLIVEIRA, M. L.; SANTOS, L. M. P.; DA SILVA, E. N. Direct healthcare cost of obesity in brazil: An application of the cost-of-illness method from the perspective of the public health system in 2011. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2015.
- DE PAULA, G. C. et al. Hippocampal Function Is Impaired by a Short-Term High-Fat Diet in Mice: Increased Blood–Brain Barrier Permeability and Neuroinflammation as Triggering Events. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, n. November, p. 1–12, 2021.
- DE SOUZA, C. T. et al. 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.
- DELUCA, H. F.; ENGSTROM, G. W. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 47, p. 1744–1750, 1961.
- DHOPESHWARKAR, G.; MEAD, J. Uptake and transport of fatty acids into the brain and the role of the blood-brain barrier system. **Advances in Lipid Research**, v. 11, p. 109–142, 1973.
- DIAZ, B. et al. Saturated lipids decrease mitofusin 2 leading to endoplasmic reticulum stress activation and insulin resistance in hypothalamic cells. **Brain Research**, v. 1627, p. 80–89, 2015.
- DIETRICH, M. O.; LIU, Z.; HORVATH, T. L. Mitochondrial dynamics controlled by

- mitofusins regulate Agrp neuronal activity and diet-induced obesity. **cell**, v. 155, n. 1, p. 188–199, 2013.
- DOUGLASS, J.; DORFMAN, M.; THALER, J. Glia: silent partners in energy homeostasis and obesity pathogenesis. **diabetologia**, v. 60, n. 2, p. 226–236, 2017.
- DYALL, S. C.; MICHAEL-TITUS, A. T. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. **NeuroMolecular Medicine**, v. 10, n. 4, p. 219–235, 2008.
- EDMOND, J. et al. Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. **Journal of Neuroscience Research**, v. 18, n. 4, p. 551–561, 1987.
- FISCHER, J. C. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, v. 153, n. 1, p. 23–36, 1985.
- FRANCIS, H. M.; STEVENSON, R. J. Higher Reported Saturated Fat and Refined Sugar Intake Is Associated With Reduced Hippocampal-Dependent Memory and Sensitivity to Interoceptive Signals. **Behavioral Neuroscience**, v. 125, n. 6, p. 943–955, 2011.
- FREEMAN, L. R.; GRANHOLM, A. C. E. Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 643–653, 2012.
- FRIEDMAN, J. R. et al. ER tubules mark sites of mitochondrial division. **Science**, v. 334, n. 6054, p. 358–362, 2011.
- GALIZZI, G. et al. Altered insulin pathway compromises mitochondrial function and quality control both in in vitro and in vivo model systems. **Mitochondrion**, v. 60, n. June, p. 178–188, 2021.
- GALLAND, F. et al. Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. **Neurochemistry International**, v. 131, n. August, p. 104538, 2019.
- GASPAR, J. M. et al. Long-term exposure to high glucose induces changes in the content and distribution of some exocytotic proteins in cultured hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 171, n. 4, p. 981–992, 2010.
- GAZDZINSKI, S. et al. Integrity in Adults. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 63, n. 5, p. 652–657, 2009.
- GÓMEZ-VALADÉS, A. G. et al. Mitochondrial cristae-remodeling protein OPA1 in POMC neurons couples Ca²⁺ homeostasis with adipose tissue lipolysis. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 9, p. 1820- 1835.e9, 2021.
- GONZÁLEZ-GIRALDO, Y. et al. Tibolone Preserves Mitochondrial Functionality and Cell

- Morphology in Astrocytic Cells Treated with Palmitic Acid. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 4453–4462, 2018.
- GREGG, E. W.; SHAW, J. E. Global Health Effects of Overweight and Obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 80–81, 2017.
- GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 415–445, 2011.
- GUPTA, S. et al. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. 6, p. 1060–1071, 2012.
- GUSTAFSON, D. et al. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, n. 13, p. 1524–1528, 2003.
- HALTIA, L. T. et al. Brain white matter expansion in human obesity and the recovering effect of dieting. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 8, p. 3278–3284, 2007.
- HANSEN, C. et al. High metabolic substrate load induces mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle microvascular endothelial cells. **Physiological Reports**, v. 9, n. 14, p. 1–17, 2021.
- HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annual Review of Biochemistry**, v. VOL. 54, p. 1015–1069, 1985.
- HEINONEN, S. et al. Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity. **Diabetes**, v. 64, n. 9, p. 3135–3145, 2015.
- HORVATH, T. L. et al. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14875–14880, 2010.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. **Immunity**, v. 47, n. 3, p. 406–420, 2017a.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177–185, 2017b.
- HOWE, A. M. et al. Palmitic Acid and Oleic Acid Differently Modulate TLR2-Mediated Inflammatory Responses in Microglia and Macrophages. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 4, p. 2348–2362, 2022.
- IBGE. **Um em cada quatro adultos do país estava obeso em 2019; Atenção Primária foi bem avaliada**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/29204-um-em-cada-quatro-adultos-do-pais-estava-obeso-em-2019>>. Acesso em: 7 abr. 2023.

- JOSEPH, J. W. et al. Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet. **Diabetes**, v. 51, n. 11, p. 3211–3219, 2002.
- JOSEPH, J. W. et al. Free fatty acid-induced β -cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 51049–51056, 2004.
- KARBOWSKI, M.; YOULE, R. J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 8, p. 870–880, 2003.
- KHARABIAN MASOULEH, S. et al. **Higher body mass index in older adults is associated with lower gray matter volume: Implications for memory performance.** [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 40
- KORNFELD, O. S. et al. Interaction of mitochondrial fission factor with dynamin related protein 1 governs physiological mitochondrial function in vivo. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.
- KRATZ, M.; BAARS, T.; GUYENET, S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 1, p. 1–24, 2013.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227–231, 1992.
- LI, H. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein promotes palmitate-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JAN, 2018.
- LIANG, J. et al. Neurocognitive correlates of obesity and obesity-related behaviors in children and adolescents. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 4, p. 494–506, 2014.
- LIZARBE, B. et al. Neurochemical modifications in the hippocampus, cortex and hypothalamus of mice exposed to long-term high-fat diet. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. JAN, p. 1–15, 2019.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.
- LV, J. et al. Mitochondrial homeostasis regulates definitive endoderm differentiation of human pluripotent stem cells. **Cell Death Discovery**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2022.
- MA, W. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the brain of diet-induced obese rats but not in diet-resistant rats. **Life Sciences**, v. 110, n. 2, p. 53–60, 2014.

- MANCINI, G. et al. A high fat/cholesterol diet recapitulates some alzheimer's disease-like features in mice: Focus on hippocampal mitochondrial dysfunction. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 82, n. 4, p. 1619–1633, 2021.
- MANEECHOTE, C. et al. Pharmacological Targeting of Mitochondrial Fission and Fusion Alleviates Cognitive Impairment and Brain Pathologies in Pre-diabetic Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 6, p. 3690–3702, 2022.
- MARTIN-JIMÉNEZ, C. et al. Tibolone Ameliorates the Lipotoxic Effect of Palmitic Acid in Normal Human Astrocytes. **Neurotoxicity Research**, v. 38, n. 3, p. 585–595, 2020.
- MELDOLESI, J. Astrocytes: News about brain health and diseases. **Biomedicines**, v. 8, n. 10, p. 1–14, 2020.
- MELO, H. M. et al. Palmitate Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Humans with Obesity and Induces Memory Impairment in Mice via Pro-inflammatory TNF- α . **Cell Reports**, v. 30, n. 7, p. 2180- 2194.e8, 2020.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Sétima ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.
- NG, Y. W.; SAY, Y. H. Palmitic acid induces neurotoxicity and gliatotoxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma and T98G human glioblastoma cells. **PeerJ**, v. 2018, n. 4, 2018.
- NICHOLAS, D. et al. Advances in the quantification of mitochondrial function in primary human immune cells through extracellular flux analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–19, 2017.
- NILSON, E. A. F. et al. Costs attributable to obesity, hypertension, and diabetes in the Unified Health System, Brazil, 2018. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 44, p. 1–7, 2020.
- NUZZO, D. et al. Regular intake of pistachio mitigates the deleterious effects of a high fat-diet in the brain of obese mice. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 1–16, 2020.
- OKAMOTO, K.; SHAW, J. M. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 503–536, 2005.
- ORTIZ-RODRIGUEZ, A. et al. Lipotoxic Effects of Palmitic Acid on Astrocytes Are Associated with Autophagy Impairment. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 3, p. 1665–1680, 2019.
- OSORIO-PAZ, I. et al. Mitochondrial activity in different regions of the brain at the onset of streptozotocin-induced diabetes in rats. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 871–879, 2018.
- PALOMER, X. et al. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2

- Diabetes Mellitus. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 178–190, 2018.
- PARDRIDGE, W. M.; MIETUS, L. J. Palmitate and Cholesterol Transport Through the Blood-Brain Barrier. **Journal of Neurochemistry**, v. 34, n. 2, p. 463–466, 1980.
- PARK, H. S.; CHO, H. S.; KIM, T. W. Physical exercise promotes memory capability by enhancing hippocampal mitochondrial functions and inhibiting apoptosis in obesity-induced insulin resistance by high fat diet. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 1, p. 283–292, 2018.
- PINTANA, H. et al. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of insulin-resistant rats. **Journal of Endocrinology**, v. 218, n. 1, p. 1–11, 2013.
- PUGAZHENTHI, S.; QIN, L.; REDDY, P. H. Common Neurodegenerative Pathways in Obesity, Diabetes, and Alzheimer's Disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 5, p. 1037–1045, 2018.
- PURKAYASTHA, S. et al. Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 7, p. 2939–2944, 2011.
- PUTTI, R. et al. Diet impact on Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–7, 2015.
- RAZA, H.; JOHN, A.; HOWARTH, F. C. Increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction in zucker diabetic rat liver and brain. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 1241–1251, 2015.
- REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-Aggregate Formation of a Carbocyanine as a Quantitative Fluorescent Indicator of Membrane Potential. **Biochemistry**, v. 30, n. 18, p. 4480–4486, 1991.
- ROBISON, L. S. et al. Role of sex and high-fat diet in metabolic and hypothalamic disturbances in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–20, 2020.
- RUSTIN, P. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**, v. 228, n. 1, p. 35–51, 1994.
- SAKLAYEN, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Current Hypertension Reports**, v. 20, n. 12, 2018.
- SALAS-VENEGAS, V. et al. The Obese Brain: Mechanisms of Systemic and Local Inflammation, and Interventions to Reverse the Cognitive Deficit. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 16, n. March, p. 1–19, 2022.
- SCHMITT, L. O.; GASPAR, J. M. Obesity-Induced Brain Neuroinflammatory and Mitochondrial Changes. **Metabolites**, v. 13, n. 1, 2023.

- SCHNEEBERGER, M. et al. Mitofusin 2 in POMC Neurons Connects ER Stress with Leptin Resistance and Energy Imbalance. **cell**, v. 155, n. 1, p. 1–23, 2013.
- SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 6, p. 1253–1262, 2007.
- SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 311, n. 1152, p. 617–631, 1985.
- SIINO, V. et al. Obesogenic Diets Cause Alterations on Proteins and Theirs Post-Translational Modifications in Mouse Brains. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 14, p. 117863882110124, 2021.
- SMITH, Q. R.; NAGURA, H. Fatty acid uptake and incorporation in brain: Studies with the perfusion model. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 16, n. 2–3, p. 167–172, 2001.
- STRACK, S.; CRIBBS, J. T. Allosteric modulation of Drp1 mechanoenzyme assembly and mitochondrial fission by the variable domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 14, p. 10990–11001, 2012.
- STRANAHAN, A. M. et al. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 309–317, 2008.
- SUN, K. et al. Adipose tissue remodeling and obesity Find the latest version : Review series Adipose tissue remodeling and obesity. v. 121, n. 6, p. 2094–2101, 2011.
- TERRIEN, J. et al. Reduced central and peripheral inflammatory responses and increased mitochondrial activity contribute to diet-induced obesity resistance in WSB/EiJ mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2019.
- THALER, J. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, p. 153–162, 2012.
- VALDEARCOS, M. et al. Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function Martin. **cell rep**, v. 9, n. 6, p. 2124–2138, 2014.
- WANG, Z. et al. Cytoprotective effects of melatonin on astroglial cells subjected to palmitic acid treatment in vitro. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 2, p. 253–264, 2012.
- WARD, M. A. et al. The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: A cross sectional study. **BMC Neurology**, v. 5, p. 1–7, 2005.
- WARDZINSKI, E. K. et al. Impaired brain energy gain upon a glucose load in obesity.

- Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 85, p. 90–96, 2018.
- WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, 2005.
- WEST, A. P.; SHADEL, G. S.; GHOSH, S. Mitochondria in innate immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 389–402, 2011.
- WHO. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 7 abr. 2023.
- WHO. **World Obesity Day 2022 – Accelerating action to stop obesity**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/04-03-2022-world-obesity-day-2022-accelerating-action-to-stop-obesity>>. Acesso em: 7 abr. 2023.
- WOLF, P. et al. Relation of Obesity to Cognitive Function: Importance of Central Obesity and Synergistic Influence of Concomitant Hypertension. The Framingham Heart Study. **Current Alzheimer Research**, v. 4, n. 2, p. 111–116, 2007.
- WU, S. et al. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. **FEBS Journal**, v. 278, n. 6, p. 941–954, 2011.
- YAGI, K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochemical medicine**, v. 15, n. 2, p. 212–216, 1976.
- YAN, J. et al. Obesity- and aging-induced excess of central transforming growth factor- β potentiates diabetic development via an RNA stress response. **Nature medicine**, v. 20, n. 9, p. 1001–1008, 2014.
- YANG, C. et al. Exogenous IGF-1 alleviates depression-like behavior and hippocampal mitochondrial dysfunction in high-fat diet mice. **Physiology and Behavior**, v. 229, p. 113236, 2021.
- YI, C. X. et al. TNF α drives mitochondrial stress in POMC neurons in obesity. **Nature Communications**, v. 8, n. May, 2017.
- YOULE, R. J.; NARENDRA, D. P. Mechanisms of mitophagy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 9–14, 2011.
- YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1062–1065, 2012.
- YU, G. et al. Astrocyte reactivation in medial prefrontal cortex contributes to obesity-promoted depressive-like behaviors. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 1–18, 2022.
- ZHANG, L. et al. Synergistic effect of cAMP and palmitate in promoting altered

mitochondrial function and cell death in HepG2 cells. **Experimental cell research**, v. 316, n. 5, p. 716–727, 2010.

ZHANG, TY. et al. The Role of Autophagy in Mitochondria Maintenance. **Landes bioscience**, v. 3, n. 4, p. 337–346, 2007.

ZHANG, X. et al. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress Link Overnutrition. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 61–73, 2009.