



EFEITO DA HIPERTRIGLICERIDEMIA INDUZIDA PELA SUPEREXPRESSÃO GÊNICA DA APOLIPOPROTEÍNA CIII EM CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS NO METABOLISMO HEPÁTICO DA GLICOSE A PARTIR DO SUBSTRATO L-LACTATO.

Marcos A. Primo (PIC/CNPq-FA - UEM), Vilma A. F. de Godoi
(Orientadora), Jairo A. Berti (Co-orientador)
Email: vafggazola@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá,
PR.

Área do conhecimento: Ciências Biológicas; **Sub-área do conhecimento:** Fisiologia.

Palavras-chave: apoCIII, hipertrigliceridemia, perfusão de fígado.

Resumo:

A hipertrigliceridemia e aumento dos ácidos graxos no sangue alteram substancialmente a captação periférica da glicose e pode induzir ao diabetes. Alterações na expressão gênica e protéica da apolipoproteína CIII (apoCIII) altera a captação periférica dos triglicerídeos das VLDL induzindo à hipertrigliceridemia, resistência a insulina, intolerância a glicose, esteatose hepática e aterosclerose. Dessa forma, implantamos uma colônia de camundongos C57BL6 - apoCIII transgênicos, para estudarmos o efeito do perfil lipídico alterado sobre o metabolismo hepático da glicose a partir do precursor gliconeogênico L-lactato em um sistema de perfusão de fígado *in situ*. Os resultados indicaram que a capacidade gliconeogênica a partir de L-lactato está aumentada no grupo C57BL6 - apoCIII transgênico. A hipertrigliceridemia típica desses animais pode estar mantendo alto o status energético do fígado via beta-oxidação, facilitando o fluxo de equivalentes redutores citosólicos para vias dispendiosas como a gliconeogênese e favorecendo a intolerância a glicose.

Introdução:

A resistência à insulina pode ser causada pela elevada trigliceridemia (TG), ácidos graxos livres (AGL) e metabólitos aliada a ativação da gliconeogênese hepática via ativação da proteína quinase C e aumento da taxa da transcrição de enzimas da gliconeogênese (LEE, et. al., 2011; SAVAGE, et al., 2006). Utilizando a linhagem de camundongos transgênicos que superexpressam o gene da apolipoproteína CIII e apresenta



hipertrigliceridemia (ITO, et al. 1990), estudamos, primariamente, qual seria o impacto desse modelo sobre o metabolismo hepático da glicose através da técnica de perfusão de fígado *in situ*. Dessa forma, poderemos determinar o nível de contribuição hepática sobre as variações glicêmicas induzidas pela hipertrigliceridemia expressa nesses animais. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar o efeito da hipertrigliceridemia induzida pela superexpressão do gene da apolipoproteína CIII, sobre a gliconeogênese hepática a partir do L-lactato (5 mM), em camundongos C57BL6 apoCIII transgênico (apoCIII), pela técnica de perfusão de fígado *in situ*.

Materiais e métodos:

Foram utilizados 20 camundongos machos (120 d/28 g) da linhagem C57BL6 que superexpressam a apolipoproteína CIII humana. Os camundongos transgênicos resultaram do cruzamento com camundongos C57BL6 não transgênicos. Pela genotipagem foram considerados transgênicos (CIII) os animais que apresentaram trigliceridemia ≥ 300 mg/dL e não transgênicos (NTG) ≤ 100 mg/dL. Os animais, com livre acesso à água e alimento (ração balanceada Nuvilab[®]), foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (ciclo claro-escuro de 12 h, tpt $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$). Os animais (jejum noturno 15 h) foram anestesiados (Ketamina/Xilazina 60/12 mg/kg, 0,1 mL/100 g pc), e submetidos à laparotomia. Os fígados foram perfundidos com tampão Krebs-Henseleit-Bicarbonato (KH) (pH 7,4, 37°C , saturado com O_2/CO_2 95/5%) sem precursor por 60 min (basal), e com o precursor L-lactato 5 mM por 30 min (estimulado). A produção basal de glicose representa a glicogenólise e a diferença entre a produção de glicose antes e durante a infusão do precursor representa a gliconeogênese. Amostras do fluido de perfusão efluente foram coletadas a cada 5 min e a concentração de glicose (Bergmeyer e Bernt, 1974) e piruvato (Czok & Lamprecht, 1974) foram medidas. A concentração de glicose no perfusado foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min.g}$, e a área sob a curva (AUC) foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{g}$. Os dados (média $\pm$ desvio padrão, $n=10/\text{grupo}$) foram comparados por test t de student, $p<0,05$. CIBio 3615/2013 e CEUA/UEM 020/2013.

Resultados e Discussão:

Houve produção hepática de glicose e piruvato a partir de L-lactato para ambos os grupos (Fig. 1 e 2, tempos 60 a 90 min). Não houve diferença entre os grupos, na produção de glicose e piruvato, no estado basal (Fig. 1 e 2, tempos 0 a 60 min). Apesar da produção total de glicose a partir do L-lactato ter sido igual para os dois grupos, houve uma maior produção hepática no grupo CIII comparado ao grupo NTG nos últimos 10 min de perfusão (Fig. 1, tempos 60 a 90 min e 80 a 90 min).

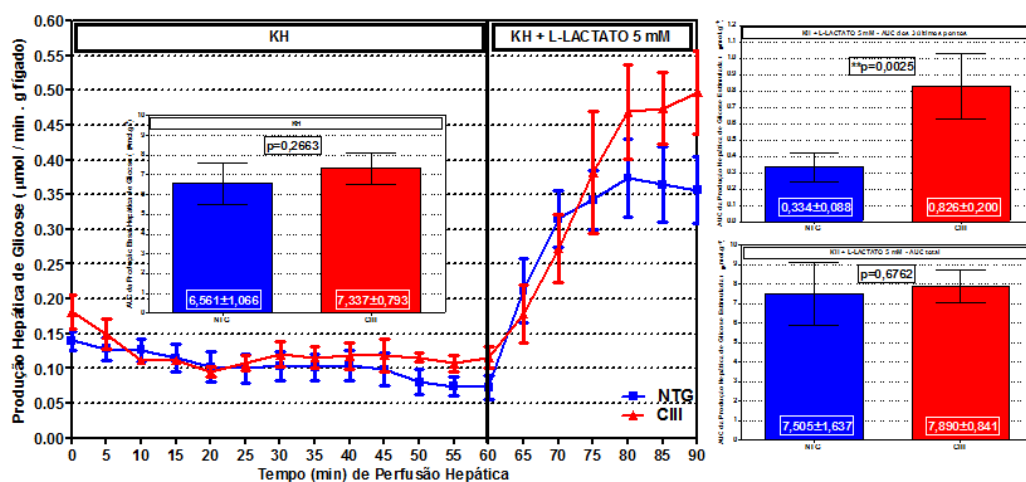


Fig. 01 – Produção hepática de glicose a partir de L-lactato 5 mM ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$) em fígados perfundidos *in situ*. As linhas e barras azuis indicam o resultado do grupo não transgênico (NTG), e as linhas e barras vermelhas indicam o resultado do grupo transgênico (CIII). As barras expressam os valores para a área sob a curva (AUC, $\mu\text{mol/g}$) no basal (0 a 60 min, dentro da figura) e estimulado total (60 a 90 min, lateral direita inferior da figura) e estimulado dos três últimos pontos (80 a 90 min, lateral direita superior da figura). Os valores das AUCs estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de 10 experimentos, $p<0,05$ (valor do p indicado na figura).

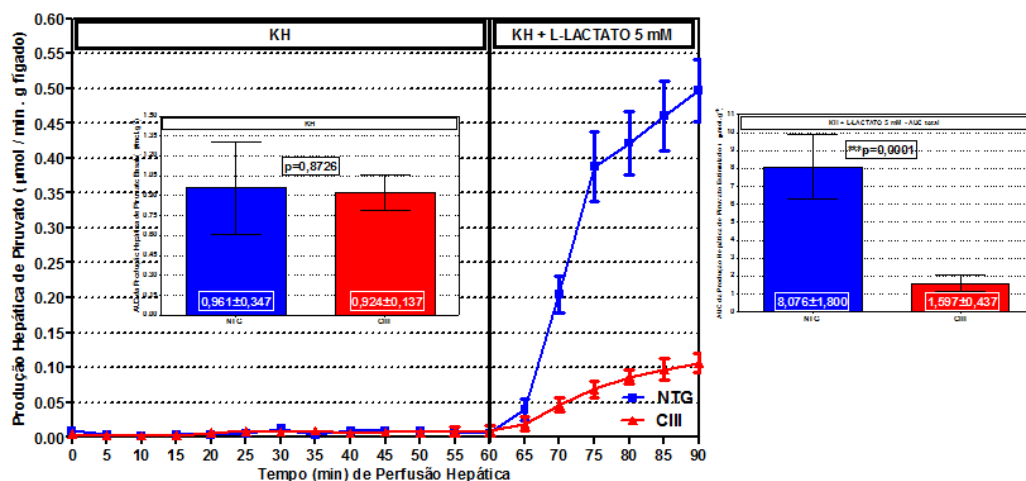
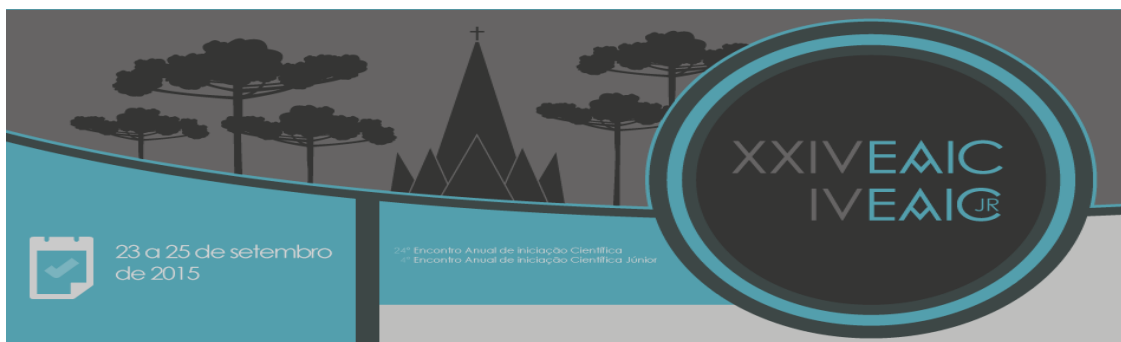


Fig. 02 – Produção hepática de piruvato a partir de L-lactato 5 mM ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$) em fígados perfundidos *in situ*. As linhas e barras azuis indicam o resultado do grupo não transgênico (NTG), e as linhas e barras vermelhas indicam o resultado do grupo transgênico (CIII). As barras expressam os valores para a área sob a curva (AUC, $\mu\text{mol/g}$) no basal (0 a 60 min, dentro da figura) e estimulado total (60 a 90 min, lateral direita da figura). Os valores das AUCs estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de 10 experimentos, $p<0,05$ (valor do p indicado na figura).

Já na produção hepática de piruvato a partir de L-lactato, houve produção maior de piruvato para o grupo CIII, comparado com o grupo NTG (Fig. 2, tempo 60 a 90 min). Os resultados indicaram que a capacidade



gliconeogênica a partir de L-lactato está aumentada no grupo CIII, com menor acúmulo de piruvato e maior conversão do piruvato à glicose. A hipertrigliceridemia típica desses animais pode estar mantendo alto o status energético do fígado via beta-oxidação. Portanto, uma maior quantidade de equivalentes redutores citosólicos pode ser direcionada para vias dispendiosas como a gliconeogênese, sem comprometer outros processos metabólicos, mas favorecendo intolerância a glicose.

Conclusões

O grupo CIII apresentou maior capacidade gliconeogênica a partir do L-lactato. Um processo que pode resultar da hipertrigliceridemia típica desses animais e do favorecimento de vias energeticamente dispendiosas como a gliconeogênese hepática.

Agradecimentos

Ao programa PIC/CNPq-FA-UEM pelo incentivo à pesquisa.

Referências

BERGMEYER H.U.; BERNT E.; Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H. U. (ed). Methods of enzymatic analysis. **New York: Verlag Chemie-Academic Press.**; 1974.

CZOK R.L.W.; Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D- glycerate-2-phosphate. In: BERGMEYER, H. U. (ed). Methods of enzymatic analysis. **New York: Academic Press.**; p.1446-1448, 1974.

ITO Y.; AZROLAN N.; O'CONNELL A.; WALSH A.; BRESLOW J.L.; Hypertriglyceridemia as a result of human apolipoprotein C-III gene expression in transgenic mice. **Science**, 249: 790–793, 1990.

LEE H.Y.; BIRKENFELD A.L.; JORNAYVAZ F.R.; JURCZAK M.J.; KANDA S.; POPOV V.; FREDERICK D.W.; ZHANG D.; GUIGNI B.; BHARADWAJ K.G.; CHOI C.S.; GOLDBERG I.J.; PARK J.H.; PETERSEN K.F.; SAMUEL V.T.; SHULMAN G.I.; Apolipoprotein CIII overexpressing mice are predisposed to diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. **Hepatology**, 25, 2011.

SAVAGE D. B.; CHOI C.S.; SAMUEL V.T.; LIU Z. X.; ZHANG D.Y.; WANG A.; ZHANG X.M.; CLINE G.W.; YU X.X.; GEISLER J.G.; BHANOT S.; MONIA. B.P.; SHULMAN G.I.; Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. **J Clin Invest.**, 116, 817– 824, 2006.