



AVALIAÇÃO DA SEQUÊNCIA TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES NA GLICOGENÓLISE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS SWISS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA RICA EM GORDURA SATURADA

Jessica Belentani (PIBIC/CNPq/Uem), Fabiana Percinoto Monteiro Schiavon, Roberto Barbosa Bazotte (Orientador), e-mail: rbbazotte@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Farmacologia e Terapêutica Clínica

Área e subárea do conhecimento: 4. Ciências da Saúde, Sub-área: 4.01.01.06 – 1 Medicina.

Palavras-chave: dieta hiperlipídica, glicogenólise, AMPc

Resumo:

Nosso objetivo foi avaliar a ativação do catabolismo do glicogênio hepático em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica rica em gordura saturada (DHRGS). Os camundongos foram divididos em dois grupos. O grupo controle recebeu dieta normolipídica (DNL) e o segundo recebeu DHRGS. Os animais foram submetidos à perfusão de fígado *in situ*. A produção hepática de glicose e a glicogenólise foram analisadas antes e durante a infusão dos agentes glicogenolíticos: glucagon, epinefrina, fenilefrina, isoproterenol, cAMP e seus análogos DB-cAMP, 8-Br-cAMP e N6-MB-cAMP. Foram também avaliados a glicemia e o conteúdo de glicogênio hepático. Os resultados demonstraram que a ativação da produção hepática de glicose e da glicogenólise pelo glucagon, epinefrina e fenilefrina foi menor no grupo DHRGS em comparação com o grupo DNL. Considerando que a infusão de glucagon promoveu uma inibição acentuada da glicólise hepática no grupo DHRGS, testamos a infusão direta de cAMP, principal mediador intracelular do hormônio glucagon. Como resultado, observou-se uma menor intensificação na produção hepática de glicose e glicogenólise no grupo DHRGS durante a infusão de cAMP. Desse modo, concluímos que a DHRGS reduz a responsividade a agentes glicogenolíticos. Portanto, a menor resposta ao glucagon no grupo DHRGS está relacionada a diferenças na quantidade de AMPc formada e não na atividade biológica do AMPc. Concluímos que a disponibilidade intracelular de AMPc é peça-chave na ativação do catabolismo hepático de glicogênio em camundongos submetidos à DHRGS.



Introdução

O consumo de dieta hiperlipídica rica em gordura saturada (DHRGS) favorece o desenvolvimento de obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares. Muitos estudos foram realizados avaliando os efeitos de DHRGS na gliconeogênese hepática em camundongos. (An et al., 2013; Haida et al., 2012; Obici et al., 2012). Contudo, pouco é conhecido sobre o catabolismo do glicogênio nesta condição.

Considerando que a ativação da gliconeogênese hepática foi observada uma semana após o fornecimento da DHRGS (Obici et al., 2012), este estudo se propõe investigar a ativação do catabolismo do glicogênio hepático em camundongos submetidos à DHRGS durante o mesmo período. Além disso, a resposta ao cAMP também será analisada, uma vez que este segundo mensageiro exerce um importante papel como segundo mensageiro na ação de hormônios como o glucagon e a epinefrina.

Materiais e métodos

Animais

Utilizaram-se camundongos Swiss machos com peso aproximado de 35 g mantidos em condições padrões de biotério, antecedendo aos experimentos. Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo controle recebeu dieta normolipídica (DNL). O segundo grupo recebeu DHRGS. As composições destas dietas foram baseadas nas dietas purificadas para roedores propostos pelo "American Institute of Nutrition".

Perfusão de fígado in situ

Após completar o período de tratamento de uma semana, os animais foram anestesiados e fixados em mesa cirúrgica. A perfusão foi realizada da seguinte forma: passagem de tampão KH por 10 min, 20 min de infusão de substratos glicogenolíticos e os 10 min finais com tampão KH. As amostras do líquido efluente foram coletadas a cada 2 min para análise da concentração de glicose, L-lactato e piruvato. Essas moléculas refletem quantitativamente a glicogenólise, e fornecem taxas basais do catabolismo hepático, podendo ser intensificadas com a infusão de agentes glicogenolíticos.

Os agentes glicogenolíticos utilizados foram: glucagon (1 nM), epinefrina (20 μ M), fenilefrina (20 μ M), isoproterenol (20 μ M). Posteriormente, foram utilizados também cAMP (150 μ M) e seus análogos DB-cAMP (3 μ M), 8-Br-cAMP (3 μ M) e N6-MB-cAMP (3 μ M).

No final do experimento, o fígado foi retirado e pesado, sendo a produção hepática de glicose e outros metabólitos expressas em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de fígado. A ativação do catabolismo do glicogênio foi estimada pela



diferença das taxas de produção de glicose, L-lactato e piruvato, glicólise e glicogenólise, antes e durante a infusão dos agentes glicogenolíticos.

Dosagem de glicogênio

Ao final do experimento da perfusão, o fígado foi retirado e mergulhado em nitrogênio líquido. A dosagem do glicogênio foi realizada de acordo com a técnica de Kepler et al (1974).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student, empregando-se o programa estatístico Graph-Pad Prism Software (version 5.0). $P < 0.05$ foi adotado como critério de significância.

Resultados e Discussão

A glicemia, o conteúdo de glicogênio do fígado e a taxa catabolismo de glicogênio antes da infusão dos agentes glicogenolíticos não foram afetados pela DHRGS, mas houve uma menor produção ($p < 0,05$) de piruvato, L-lactato, glicólise em fígados provenientes do grupo DHRGS.

A ativação da produção hepática de glicose e glicogenólise pelo glucagon, epinefrina e fenilefrina foi menor no grupo DHRGS em comparação ao grupo DNL (Tabela 1). Não houve diferença na infusão de isoproterenol. Além disso, a infusão de glucagon ou isoproterenol promoveu uma inibição acentuada da glicólise hepática no grupo DHRGS (Tabela 1).

Tabela 1. Glicose, produção de L-lactato, piruvato, glicólise e glicogenólise durante a infusão de glucagon (1 nM), epinefrina (20 μ M), fenilefrina (20 mM) ou isoproterenol (20 μ M) em fígados de ratos alimentados com dieta normolipídica (DNL) ou dieta hiperlipídica rica em gordura saturada (DHRGS) durante uma semana. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da área sob a curva expressos em μ mol/g. Os valores negativos representam a inibição da produção de piruvato, L-lactato e glicólise durante a infusão de glucagon, epinefrina, fenilefrina e isoproterenol em comparação com os valores basais. * $p < 0.05$ (DNL vs. DHRGS).

	Glucagon		Epinefrina		Fenilefrina		Isoproterenol	
	DNL	DHRGS	DNL	DHRGS	DNL	DHRGS	DNL	DHRGS
Glicose	76,3 \pm 13,8	24,7 \pm 5,2*	53,3 \pm 12,7	27,6 \pm 4,3*	16,9 \pm 6,3	6,7 \pm 1,3*	11,3 \pm 4,2	16,3 \pm 6,9
L-lactato	-1,7 \pm 2,2	-7,5 \pm 3,2*	4,1 \pm 0,86	4,2 \pm 1,0	3,1 \pm 1,6	1,2 \pm 0,48*	-5,5 \pm 2,8	-10,4 \pm 3,0*
Piruvato	-1,0 \pm 0,28	-0,54 \pm 0,25*	-0,52 \pm 0,49	-0,36 \pm 0,18	-0,5 \pm 0,2	-0,05 \pm 0,03*	-0,47 \pm 0,18	-0,34 \pm 0,14
Glicólise	-2,7 \pm 2,1	-8,1 \pm 3,6*	3,7 \pm 1,3	4,3 \pm 0,8	2,5 \pm 1,7	1,0 \pm 0,27	-6,4 \pm 2,2	-10,9 \pm 1,7*
Glicogenólise	75,2 \pm 14,4	20,5 \pm 5,8*	55,9 \pm 14,1	29,0 \pm 4,6*	21,0 \pm 7,4	6,2 \pm 2,6*	8,3 \pm 2,6	11,6 \pm 4,4



Como o glucagon mostrou maior efeito no catabolismo do glicogênio e considerando que estes efeitos são mediados pelo cAMP, avaliou-se os efeitos da infusão de cAMP no catabolismo do glicogênio hepático.

Durante a infusão de cAMP (150 μ M) observou-se uma menor intensificação na produção hepática de glicose e glicogenólise no grupo DHRGS. Entretanto, a infusão de DB-cAMP (3 μ M), 8-Br-cAMP (3 μ M) ou N6-MB-cAMP (3 μ M) não mostrou diferenças relevantes.

Conclusões

A DHRGS reduz a responsividade a agentes glicogenolíticos que provavelmente envolvem mecanismos mediados pelo cálcio (fenilefrina) e AMPc (glucagon e epinefrina). A menor resposta ao glucagon e à epinefrina no grupo DHRGS está relacionado a diferenças na quantidade de AMPc formada e não na atividade biológica do AMPc. Portanto, a disponibilidade intracelular de AMPc é peça-chave na ativação do catabolismo hepático de glicogênio em camundongos submetidos à DHRGS.

Agradecimentos

Universidade Estadual de Maringá e CNPq – UEM

Referências

AN Y, XU W, LI H, LEI H, ZHANG L, HAO F ET AL. High-fat diet induces dynamic metabolic alterations in multiple biological matrices of rats. **Proteome Res**, 2013; 12(8): 3755-68

HAIDA KS, BERTACHINI G, TAVONI T, GUILHERMETTI M, LOURES MR, BAZOTTE RB. Infliximab treatment prevents hyperglycemia and the intensification of hepatic gluconeogenesis in an animal model of high fat diet-induced liver glucose overproduction. **Braz Arch Biol Technol**, 2012; 55: 389-94

KEPLER D, DECKER K. Glycogen determination with amyloglucosidase. In: Methods of Enzymatic Analysis. Ed. Bergmeyer HU, **Academic Press**, New York, 1974, 1127–31.

OBICI S, TAVONI TM, BARRENA HC, CURI R, BAZOTTE RB. Time sequence of the intensification of the liver glucose production induced by high-fat diet in mice. **Cell Biochem Funct**, 2012; 30: 335-59.