# EFEITO DA DISLIPIDEMIA POR SUPEREXPRESSÃO DA APOCIII HUMANA SOBRE HEPATÓCITOS DE CAMUNDONGAS

Ana Luiza Lobo de Andrade (PIC/UEM), Smyrnna Cele Cabral Maia Sale (Pesquisadora), Jairo Augusto Berti (Coorientador), Carmem Patrícia Barbosa (Orientadora). E-mail: cpbarbosa@uem.br.

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

**Área e subárea do conhecimento: Morfologia / Histologia.**

Palavras-chave: colágeno; fígado; hipertrigliceridemia.

## RESUMO

A apolipoproteína C-III (apoCIII) participa da regulação do metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos, e sua superexpressão está associada à hipertrigliceridemia e a alterações metabólicas hepáticas. O presente estudo avaliou os efeitos da dislipidemia decorrente da superexpressão da apoCIII humana e da idade sobre a deposição de colágeno no tecido hepático de camundongas. Foram analisadas lâminas hepáticas coradas por Picrosirius Red de 37 camundongas transgênicas para apoCIII humana e não transgênicas, distribuídas nas idades de 3, 6–8 e 20 meses. Fotomicrografias de campos perivasculares padronizados foram obtidas sob luz polarizada, e a área de colágeno birrefringente foi quantificada digitalmente e expressa como porcentagem da área do campo, considerando-se cada animal como unidade experimental. Após transformação por ln(1+x), os valores médios por animal foram submetidos à análise de variância de duas vias. Não foram observados efeitos estatisticamente significativos do genótipo [$F(1, 31) = 1{,}205$; $p = 0{,}281$], da idade [$F(2, 31) = 1{,}864$; $p = 0{,}172$] ou da interação genótipo × idade [$F(2, 31) = 0{,}607$; $p = 0{,}551$]. A análise de sensibilidade envolvendo um animal com provável inadequação técnica relacionada à polarização não alterou a interpretação dos resultados. Nas condições avaliadas, a superexpressão da apoCIII humana não esteve associada a uma alteração estatisticamente demonstrável da deposição de colágeno nos campos hepáticos analisados, e esse comportamento não foi significativamente modificado pela idade.

## INTRODUÇÃO

As dislipidemias compreendem alterações quantitativas e/ou qualitativas das lipoproteínas plasmáticas e podem decorrer de fatores genéticos, metabólicos e ambientais. Entre as proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico, destaca-se a apolipoproteína C-III (apoCIII), expressa principalmente no fígado e no intestino e associada à regulação das lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Concentrações elevadas de apoCIII relacionam-se à hipertrigliceridemia por interferirem no metabolismo e na depuração dessas partículas (Ramms; Gordts, 2018). A relação

causal entre a superexpressão da apoCIII e a hipertrigliceridemia foi demonstrada em camundongos transgênicos que expressam o gene humano APOC3 (Ito et al., 1990).

O fígado ocupa posição central no metabolismo lipídico e pode ser suscetível às alterações metabólicas associadas à superexpressão da apoCIII. Em camundongos transgênicos, a superexpressão dessa apolipoproteína foi associada a maior predisposição à esteatose e à resistência insulínica hepática quando os animais foram submetidos à dieta rica em gordura (Lee et al., 2011). A deposição excessiva de colágeno integra o processo de fibrogênese hepática e envolve resposta persistente à injúria, ativação de células estreladas e desequilíbrio entre síntese e degradação da matriz extracelular (Friedman, 2008). O envelhecimento também pode modificar o remodelamento dessa matriz, com maior persistência do colágeno em modelos experimentais de lesão hepática (Delire et al., 2017).

O Picrosirius Red, associado à microscopia sob luz polarizada, permite evidenciar fibras colágenas birrefringentes e realizar sua quantificação morfométrica. Contudo, as tonalidades observadas sob polarização dependem também da orientação, espessura e organização das fibras, não devendo ser utilizadas isoladamente para identificar tipos moleculares específicos de colágeno (Lattouf et al., 2014). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da dislipidemia decorrente da superexpressão da apoCIII humana sobre a deposição de colágeno no tecido hepático de camundongas transgênicas e não transgênicas em diferentes idades.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas lâminas hepáticas de 37 camundongas C57BL/6 provenientes do projeto experimental ao qual este PIC esteve vinculado, distribuídas em seis grupos segundo genótipo e idade: transgênicas para apoCIII humana (TG) aos 3 meses (n = 7), TG aos 6–8 meses (n = 7), TG aos 20 meses (n = 6), não transgênicas (NTG) aos 3 meses (n = 6), NTG aos 6–8 meses (n = 5) e NTG aos 20 meses (n = 6). As etapas de manutenção dos animais, eutanásia, coleta dos fígados, processamento histológico e preparo das lâminas foram realizadas previamente no projeto-base, cadastrado no SGP/UEM sob o processo nº 1379/2023, com documentação institucional nº 6201190623 para as instâncias pertinentes de ética/biossegurança. As atividades deste PIC concentraram-se no processamento de amostras, aquisição das fotomicrografias, análise histomorfométrica e análise estatística. As amostras foram previamente fixadas em paraformaldeído por 24 horas, transferidas para álcool 70%, desidratadas, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes transversais semisseriados de 5 µm, e o presente estudo utilizou exclusivamente lâminas coradas por Picrosirius Red. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Nikon Eclipse, objetiva de 40×, acoplado à câmera Nikon DS-Fi1c e equipado com sistema de polarização. Os campos foram padronizados em região perivascular, mantendo-se um vaso como referência central. Ao final, foram analisadas 1.266 fotomicrografias, com 8 a 36 capturas disponíveis por animal.

A histomorfometria foi realizada no Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics). As regiões birrefringentes foram selecionadas visualmente e quantificadas pela ferramenta Bright Objects seguida de Count/Size, utilizando-se a soma das áreas positivas no campo. A variável primária foi a porcentagem da área do campo ocupada por colágeno birrefringente. As capturas foram consideradas subamostras e a camundonga, unidade experimental; para a inferência, utilizou-se a média das capturas de cada animal. Em razão da assimetria dos valores brutos, aplicou-se a transformação ln(1+x). Após a transformação, avaliaram-se a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Aplicou-se ANOVA de duas vias, com somas de quadrados tipo II, para genótipo, idade e interação genótipo × idade, adotando-se $p < 0,05$ e $\eta p^2$ (eta quadrado parcial) como tamanho de efeito. Também foi realizada análise de sensibilidade excluindo-se o animal 3361, cujo conjunto de aquisições apresentou provável inadequação técnica relacionada à polarização.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise histológica permitiu identificar colágeno birrefringente predominantemente nas regiões perivasculares padronizadas, com variabilidade visual entre animais e grupos. Na análise descritiva as médias de área de colágeno foram: TG 3 meses, 7,78 ± 8,34%; TG 6–8 meses, 22,66 ± 28,74%; TG 20 meses, 4,72 ± 5,75%; NTG 3 meses, 25,04 ± 22,71%; NTG 6–8 meses, 25,18 ± 33,47%; e NTG 20 meses, 7,13 ± 4,18%. Após a transformação ln(1+x), os resíduos apresentaram distribuição compatível com a normalidade (Shapiro-Wilk, $p = 0,602$) e não houve evidência de heterogeneidade das variâncias entre os seis grupos (Levene, $p = 0,295$).

A ANOVA de duas vias não demonstrou efeito estatisticamente significativo do genótipo [$F(1, 31) = 1,205$; $p = 0,281$; $\eta p^2 = 0,037$], da idade [$F(2, 31) = 1,864$; $p = 0,172$; $\eta p^2 = 0,107$] ou da interação genótipo × idade [$F(2, 31) = 0,607$; $p = 0,551$; $\eta p^2 = 0,038$]. A análise de sensibilidade com exclusão do animal 3361 manteve não significativos os efeitos de genótipo ($p = 0,158$), idade ($p = 0,320$) e interação ($p = 0,475$), indicando que a interpretação global não dependeu dessa observação.

A ausência de diferença significativa na área de colágeno não exclui outras alterações hepáticas relacionadas à apoCIII. Em modelo transgênico, Lee et al. (2011) observaram maior susceptibilidade a alterações metabólicas hepáticas especialmente diante de dieta rica em gordura, sugerindo que a apoCIII possa atuar como fator de susceptibilidade sem necessariamente produzir, de forma isolada, aumento consistente da deposição de colágeno. Da mesma forma, o efeito do envelhecimento sobre a fibrogênese descrito por Delire et al. (2017) ocorreu em contexto de injúria hepática experimental, diferente do modelo de dislipidemia genética avaliado neste estudo.

A elevada variabilidade interindividual observada deve ser considerada na interpretação. Além da heterogeneidade biológica, variações técnicas na aquisição sob polarização podem modificar o sinal birrefringente, motivo pelo qual a análise foi restrita à área total de colágeno, sem inferência sobre tipos moleculares específicos

de colágeno (Lattouf et al., 2014). A amostragem também foi espacialmente delimitada a campos perivasculares e o número de capturas variou entre os animais; portanto, os valores não representam uma estimativa estereológica da fibrose de todo o fígado. Ainda assim, a utilização de cada animal como unidade experimental evitou a consideração das múltiplas imagens como observações independentes.

## CONCLUSÕES

Nas condições experimentais avaliadas, a superexpressão da apoCIII humana não esteve associada a uma alteração estatisticamente significativa da porcentagem de área ocupada por colágeno nos campos hepáticos perivasculares analisados. Também não foram observados efeitos significativos da idade nem interação entre idade e genótipo. As diferenças numéricas e a variabilidade entre os grupos não forneceram evidência suficiente de efeito sistemático da transgenia ou do envelhecimento sobre a deposição de colágeno pela abordagem histomorfométrica empregada. Esses achados devem ser interpretados no contexto da amostragem perivascular utilizada e não equivalem à demonstração de ausência de outras alterações hepáticas ou de fibrose em todo o órgão.

## REFERÊNCIAS

DELIRE, B. et al. Aging enhances liver fibrotic response in mice through hampering extracellular matrix remodeling. **Aging**, Albany, NY, v. 9, n. 1, p. 98-113, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.18632/aging.101124. Acesso em: 18 jul. 2026.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**, Philadelphia, PA, v. 134, n. 6, p. 1655-1669, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003. Acesso em: 18 jul. 2026.

ITO, Y. et al. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. **Science**, [S. l.], v. 249, n. 4970, p. 790-793, 1990. Disponível em: https://doi.org/10.1126/science.2167514. Acesso em: 18 jul. 2026.

LATTOUF, R. et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Thousand Oaks, CA, v. 62, n. 10, p. 751-758, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1369/0022155414545787. Acesso em: 18 jul. 2026.

LEE, H.-Y. et al. Apolipoprotein CIII overexpressing mice are predisposed to diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. **Hepatology**, Baltimore, MD, v. 54, n. 5, p. 1650-1660, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1002/hep.24571. Acesso em: 18 jul. 2026.

RAMMS, B.; GORDTS, P. L. S. M. Apolipoprotein C-III in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 29, n. 3, p. 171-179, 2018.

Disponível em: https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000502. Acesso em: 18 jul. 2026.