

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

Kassiana Mafra Bicalho

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO
METABOLISMO HEPÁTICO: do nascimento à vida adulta**

Belo Horizonte

2019

Kassiana Mafra Bicalho

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO
METABOLISMO HEPÁTICO: do nascimento à vida adulta**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Co-orientadora: Dra. Máisa Mota Antunes

Belo Horizonte

2019

043

Bicalho, Kassiana Mafra.

Avaliação do perfil de expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático: do nascimento à vida adulta [manuscrito] / Kassiana Mafra Bicalho. – 2019.

92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes. Co-orientadora: Dra. Maísa Mota Antunes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Fígado /metabolismo. 3. Recém-Nascido /crescimento & desenvolvimento. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Antunes, Maísa Mota. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
KASSIANA MAFRA BICALHO

311/2019
entrada
1º/2017
2017671376

Às **quatorze horas** do dia **18 de janeiro de 2019**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO HEPÁTICO: DO NASCIMENTO À VIDA ADULTA**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Gustavo Batista de Menezes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	APROVADA
Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa	UFMG	APROVADA
Dr. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 18 de janeiro de 2019.**

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador) _____

Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa _____

Dr. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida _____

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB/UFMG

Erika Cristina Jorge

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Viçosa e à UFV pela formação acadêmica e por todas as vivências pessoais que me fizeram quem sou hoje. Levo essa história com muito orgulho e saudades no coração. Agradeço também a todos os amigos desse tempo – Maria, Luan, Franklin, Filipe, Fernanda, André, Dri – e ao companheiro Ezequiel que divide a vida comigo. Obrigada por todo companheirismo nessa jornada e por estarem comigo ainda hoje tornando a vida mais bonita.

À UFMG e Belo Horizonte por me acolherem e se tornarem meu novo lar. Especialmente ao Gustavo Menezes por me acolher em seu lab sem me conhecer. Você chegou em um momento de muitas frustrações e desânimo e abriu novamente minhas esperanças. Serei eternamente grata pela oportunidade e pela sorte em ter te encontrado. Seu trabalho pela ciência é incrível e o grupo que você construiu mais ainda.

Aos amigos do CGB de hoje – Brenda, Matheus, Ariane, Camila, Maísa, Mateus, Hortência, Maria Alice, Karen, Gabriel, Alesandra, Gustavo – e aos que já se foram – Alan, Débora, Érika, Viviane, Raquel, Jorge. Vocês me inspiram todos os dias em busca de ser melhor. Obrigada pela ajuda nos experimentos e por dividirem os ensinamentos. Crescemos sempre juntos! Obrigada também por tornarem o dia a dia tão leve e divertido. Aqui encontrei amigos que sempre vou levar comigo.

À minha família, especialmente à minha mãe e avós pelo maior amor do mundo. À minha mãe que me ensinou tanto nessa vida e está presente em todas as dificuldades e conquistas.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular pela dedicação ao trabalho. Às agências financiadoras que permitiram a realização desse trabalho e mantém o funcionamento de nossa pesquisa.

Por fim, a todos que contribuíram para este trabalho direta ou indiretamente.

RESUMO

O fígado é responsável por realizar diversas funções vitais como eliminação de substâncias tóxicas, produção de bile, ureia e proteínas plasmáticas, além de possuir importante papel imunológico. Além disso, entre suas principais funções se encontra o controle do metabolismo energético corporal. Essa função é realizada pelos hepatócitos, principais células que formam o parênquima hepático e onde ocorrem os processos de glicólise, gliconeogênese, síntese de glicogênio, e síntese e oxidação de ácidos graxos. O desenvolvimento dos hepatócitos se inicia no período embrionário e continua ainda pelo período pós-natal, transformando o fígado de um órgão hematopoiético para metabólico. Durante o desenvolvimento, o indivíduo passa por desafios nutricionais na transição da nutrição fetal para o aleitamento e desmame e o fígado, sendo um órgão muito importante para o metabolismo corporal, deve sofrer adaptações para se adequar a essas mudanças. A função do fígado no feto e no adulto já é bem descrita na literatura, no entanto o período neonatal, em que ocorrem grandes transições nutricionais, é pouco estudado. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o estado metabólico do fígado ao longo do desenvolvimento neonatal e as possíveis interferências da dieta nesse processo. Nós mostramos que tanto a função hepática quanto a expressão de enzimas metabólicas no início do desenvolvimento neonatal encontram-se reduzidas, indicando, ainda, uma transição para a aquisição da capacidade metabólica do órgão. O perfil de expressão dos genes metabólicos se torna semelhante ao adulto na terceira semana, período do desmame. Observou-se ainda que o desmame precoce altera esse programa de desenvolvimento com a elevação na expressão gênica metabólica, a qual persiste até a fase adulta. O animal, portanto, passa por várias mudanças metabólicas ao longo do desenvolvimento até a aquisição do perfil metabólico do órgão adulto.

Palavras-chave: Fígado. Metabolismo Hepático. Desenvolvimento Neonatal.

ABSTRACT

The liver is an important organ performing many body vital functions like elimination of toxic substances, production of bile, urea, plasma proteins and an immune function. Besides, among its main functions is the energy metabolism control. This function is performed by hepatocytes, the major hepatic parenchyma cells, in which occurs glycolysis, gluconeogenesis, glycogen synthesis, synthesis and oxidation of fatty acids. The hepatocyte formation begins on embryonic period and continues in postnatal period, transforming the liver from a hematopoietic organ to a metabolic one. During development an individual faces 3 nutritional challenges and the liver, being an important metabolic organ, must adapt to these changes. We know very well about this organ function on fetus and adult. However this neonatal period of large nutritional transitions is little studied. Therefore, the aim of this work was to analyze the metabolic status of liver through neonatal development and possible diet interferences on this process. Besides the reduced hepatic function, we observed a reduced metabolic enzyme expression on the beginning of neonatal development, indicating that there is still a transition to acquire the metabolic capacity of the organ. The expression profile becomes similar to adult on third week, period of weaning. We observed, yet, that early weaning alters the development program with elevation on gene expression that persists until adult age. The animal passes through many metabolic changes on development until the acquisition of the adult metabolic profile.

Keywords: Liver. Hepatic Metabolism. Neonatal Development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - Via da Glicólise.....	14
Ilustração 2 - Via da Gliconeogênese.....	15
Ilustração 3 - Metabolismo de Glicogênio.....	17
Ilustração 4 - Transporte intracelular via FABP.....	19
Ilustração 5 - Oxidação de Ácidos Graxos.....	20
Ilustração 6 - Biossíntese de Ácidos Graxos.....	22
Ilustração 7 - Estrutura de gotícula lipídica.....	23
Ilustração 8 - Metabolismo de Ácidos Biliares.....	26
Ilustração 9 - Visão geral do metabolismo hepático.....	28
Ilustração 10 - Desenvolvimento embrionário hepático.....	29
Ilustração 11 - Arquitetura hepática no desenvolvimento neonatal.....	31
Ilustração 12 - Delineamento experimental do grupo controle.....	34
Ilustração 13 - Delineamento experimental do grupo desmame precoce.....	35
Ilustração 14 - Teste de função hepática.....	35
Quadro 1 - Sequência dos iniciadores dos genes analisados por qPCR	38-40
Figura 1 - Função hepática ao longo do desenvolvimento.....	42
Figura 2 - Acúmulo de lipídeos hepáticos ao longo do desenvolvimento.....	44
Figura 3 - Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos ao longo do desenvolvimento.....	47
Figura 4 - Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos ao longo do desenvolvimento.....	49
Figura 5 - Expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos ao longo do desenvolvimento.....	50

Figura 6 - Expressão gênica de enzimas do metabolismo de ácidos biliares e xenobióticos ao longo do desenvolvimento.....	52
Figura 7 - Expressão gênica de aminotransferases e proteínas carreadoras ao longo do desenvolvimento.....	54
Figura 8 - Expressão gênica do metabolismo hepático durante o desenvolvimento normal.....	56
Figura 9 - Evolução ponderal dos animais controle e desmame precoce.....	58
Figura 10 - Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos ao longo do desenvolvimento e após desmame precoce.....	59
Figura 11 - Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos ao longo do desenvolvimento e após desmame precoce.....	60
Figura 12 - Expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos ao longo do desenvolvimento e após desmame precoce.....	61
Figura 13 - Expressão gênica de enzimas do metabolismo de ácidos biliares e xenobióticos ao longo do desenvolvimento e após desmame precoce.....	62
Figura 14 - Expressão gênica de aminotransferases e proteínas carreadoras ao longo do desenvolvimento e após desmame precoce.....	63
Figura 15 - Expressão gênica do metabolismo hepático após desmame precoce....	64
Figura 16 - Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos uma semana após desmame.....	66
Figura 17 - Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos uma semana após desmame.....	67
Figura 18 - Expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos uma semana após desmame.....	68
Figura 19 - Expressão gênica de enzimas do metabolismo de ácidos biliares e xenobióticos uma semana após desmame.....	69

Figura 20 - Expressão gênica de aminotransferases e proteínas carreadoras uma semana após desmame.....70

LISTA DE ABREVIATURAS

ACBP - Proteína de ligação a acil-CoA
ACC - Acetil-CoA Carboxilase
Acox1 - Acil-CoA Oxidase 1
ACS - Acil-CoA Sintetase
ACTB - Beta Actina
ADP - Adenosina Difosfato
ADRP - Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócito
Afp - Alfa-Fetoproteína
Alb - Albumina
APAP – Acetaminofeno (Paracetamol)
Apoa1 - Apolipoproteína A1
ApoE - Apolipoproteína E
ATP - Adenosina Trifosfato
CA - Ácido Cólico
Cact - Carreador Carnitina/Acilocarnitina
CDCA - Ácido Xenodeoxicólico
Ces - Carboxiesterase
Cpt1a - Carnitina Palmitoiltransferase 1
Ct – Threshold Cycle
Cyp - Citocromo P450
Cyp8b1 - Citocromo P450 8b1
DCA - Ácido Deoxicólico
DGAT - Diacilglicerol Aciltransferase
Elovl3 - Ácido Graxo Elongase 3
Fabp1 - Proteína de Ligação a Ácidos Graxos 1
FADS - Ácido Graxo Desaturase
Fasn - Ácido Graxo Sintase
FAT - Translocase de Ácido Graxo
FATP - Proteína de Transporte de Ácido Graxo
Fbp1 - Frutose-1,6-Bisfosfatase
Fmo - Monoxigenase Contendo Flavina
Gapdh - Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase

Glut2 - Transportador de Glicose 2
Got1(AST) - Aspartato Aminotransferase
Gpt2 (ALT) - Alanina Aminotransferase
GSH – Glutationa reduzida
Gstp1 - Glutationa S-Transferase P1
GTP - Guanosina Trifosfato
Gys2 - Glicogênio Sintase 2
G6pc - Glicose-6-Fosfatase
HDL - Lipoproteína de Alta Densidade
Hk1 - Hexoquinase 1
HL - Lipase Hepática
Hsd3b7 - 3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 7
ICG - Verde de Indocianina
IV - Intravenoso
KC - Célula de Kupffer
LCA - Ácido Litocólico
LCFA- Ácido Graxo de Cadeia Longa
LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade
Lrp10 - Proteína Relacionada com o Receptor de LDL 10
Lpl - Lipase Lipoprotéica
MCA - Ácido Muricólico
MCFA – Ácido Graxo de Cadeia Média
MGAT - Monoacilglicerol Aciltransferase
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
Nat - N-acetil Transferase
NEFA - Ácido Graxo Não Esterificado
Pck1 - Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase 1
Pfk1 – Fosfofrutoquinase
Pgm – Fosfoglicomutase
Pklr - Piruvato Quinase
Plin2 - Perilipina 2
Pygl - Glicogênio Fosforilase
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
RPL4 - Proteína Ribossomal L4

Scd1 - Stearoyl-CoA Desaturase

SCFA - Ácido Graxo de Cadeia Curta

SDHA - Complexo da Succinato Desidrogenase, Subunidade A

slgA - Imunoglobulina A Secretória

Slc27a5 - Carreador de Solute 27a5

Sult - Sulfotransferase

UDCA - Ácido Ursodeoxicólico

Ugt1a1 - UDP Glucuronosiltransferase 1a1

Ugt1a6 - UDP Glucuronosiltransferase 1a6

VLDL - Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O Fígado – caracterização geral	16
1.2 Funções do Fígado	17
1.2.1 Metabolismo de Carboidratos	18
1.2.1.1 Glicólise	18
1.2.1.2 Gliconeogênese.....	20
1.2.1.3 Metabolismo de Glicogênio	22
1.2.2 Metabolismo de Lipídeos	23
1.2.2.1 Transporte de ácidos graxos no plasma sanguíneo	23
1.2.2.2 Captura e Transporte Intracelular de Ácidos Graxos.....	24
1.2.2.3 Oxidação de Ácidos Graxos	25
1.2.2.4 Biossíntese de Ácidos Graxos.....	27
1.2.2.5 Destinos dos Triglicerídeos: Gotículas Lipídicas	28
1.2.2.6 Destinos dos Triglicerídeos: VLDL	29
1.2.2.7 Metabolismo de Ácidos Biliares.....	31
1.2.3 Metabolismo de Xenobióticos	32
1.3 Transição hepática neonatal	34
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. METODOLOGIA.....	40
4.1. Animais experimentais	40
4.2. Delineamento Experimental	40
4.3. Teste de depuração do verde de indocianina (cardiogreen)	41
4.4. Avaliação de estoque lipídico no fígado por Microscopia Confocal <i>ex vivo</i>	42
4.5. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (qPCR)	42
4.5.1. Extração de RNA total do fígado.....	42
4.5.2. Síntese de cDNA	43
4.5.3. PCR quantitativo (qPCR)	43
4.5.3.1 Controle endógeno	43
4.5.3.2 Determinação da expressão gênica	43

4.6. Quantificação da atividade de ALT e AST por ensaios enzimáticos	48
4.7. Análise dos Dados	48
5. RESULTADOS	49
5.1. A função depurativa hepática é menor até a segunda semana após o nascimento.....	49
5.2 Há maior acúmulo de lipídeos no fígado até a primeira semana após o nascimento.....	50
5.3. O perfil de expressão gênica sugere menor atividade metabólica do fígado nos estágios iniciais do desenvolvimento pós-natal	52
5.3.1 Metabolismo de Glicose.....	52
5.3.2 Metabolismo de Lipídeos	55
5.3.3 Metabolismo de Ácidos Biliares e Xenobióticos.....	58
5.3.4 Proteínas Plasmáticas e Aminotransferases	60
5.4. O desmame precoce altera a expressão de genes relacionados ao metabolismo.....	64
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Fígado – caracterização geral

O fígado é o segundo maior órgão do corpo e encontra-se localizado na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma (VOLLMAR; MENGER, 2009). O aporte sanguíneo ao órgão é feito pela veia porta - responsável por 70 a 80% do sangue que chega ao fígado e transportando sangue pouco oxigenado e rico em nutrientes vindo do intestino, pâncreas e baço - e a artéria hepática – responsável pelo transporte de sangue rico em oxigênio vindo do tronco celíaco da aorta abdominal. Nos capilares sinusoides hepáticos, sangue venoso e arterial, então, se misturam e deixam o órgão pela veia hepática. Assim, sua localização anatômica entre a circulação portal e sistêmica permite ao fígado o desempenho de suas funções imunes e metabólicas características, processando antígenos e nutrientes antes de sua chegada à outros órgãos. Estruturalmente, o fígado se divide em quatro lobos e possui como unidade estrutural funcional o lóbulo hepático. Essa unidade é caracterizada por cordões de hepatócitos dispostos em torno de uma veia central, entremeados por capilares sinusoides e circundados por 3 a 6 espaços porta (GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015). O espaço porta é constituído por tecido conjuntivo, nervos, vasos linfáticos, ductos biliares e ramos dos vasos sanguíneos, veia porta e artéria hepática. Ductos biliares, veia porta e artéria hepática formam a tríade portal (VOLLMAR; MENGER, 2009).

Os hepatócitos são as células funcionais que constituem o parênquima hepático, correspondendo a cerca de 80% da massa do fígado (GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015). São células epiteliais poliédricas, com um ou mais núcleos, e abundante retículo endoplasmático. Possuem uma superfície sinusoidal, em contato com o sinusóide, e uma superfície canalicular, a qual forma o canalículo biliar onde é secretada a bile. Os hepatócitos possuem funções específicas de acordo com sua localização mais próxima à veia central ou mais próxima ao sistema porta (BEATH, 2003). A região denominada zona 1 se encontra mais próxima ao sistema porta e, assim, as células localizadas nessa zona estão em contato com sangue rico em nutrientes e oxigênio, sendo responsáveis pela maioria das funções metabólicas como gliconeogênese, síntese de glicogênio, síntese de proteínas e metabolismo de lipídeos. É, ainda, a região com maior concentração de bile e maior capacidade de captura de quilomícrons. A zona 3, por sua vez, se encontra mais

próxima à veia central. As células localizadas nessa região recebem sangue com menor teor de oxigênio e nutrientes – já consumidos pelas células da zona 1 e 2 –, sendo então responsáveis pelos processos de biotransformação, glicólise e síntese de ureia. A função das células da zona 2 depende de sua proximidade com as zonas 1 e 3 (GRIJALVA; VAKILI, 2013).

Além dos hepatócitos, outros tipos celulares também fazem parte da constituição do fígado. Os colangiócitos são células epiteliais que delimitam o ducto biliar (GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015), enquanto as células endoteliais formam uma camada de células descontínua que constituem os capilares sinusoides, os quais partindo do espaço porta, entremeiam os cordões de hepatócitos e desembocam na veia central. Também fazem parte da estrutura do fígado várias células imunes, incluindo células dendríticas, células de Kupffer (KCs) - macrófagos residentes do fígado, localizados dentro dos sinusoides – e linfócitos (GRIJALVA; VAKILI, 2013; JENNE; KUBES, 2013).

1.2 Funções do Fígado

O fígado realiza diversas funções vitais ao funcionamento e manutenção da homeostase do organismo. Antígenos alimentares, produtos microbianos, bactérias que habitam o trato gastrointestinal ou bactérias patogênicas podem ultrapassar a barreira intestinal e chegar à corrente sanguínea. Através da circulação portal, esses antígenos alcançam o fígado onde são capturados pelas células de Kupffer sendo impedidos, assim, de alcançar a circulação sistêmica e atingir outros órgãos. As KCs também têm importante participação em processos inflamatórios e no processo de hemocaterese, ou seja, destruição de hemácias senescentes (JENNE; KUBES, 2013). Desse modo, o fígado possui importante papel de imunovigilância enquanto deve ser capaz de tolerar uma grande carga de moléculas com potencial imunogênico provenientes de microrganismos e da dieta.

Além da função imune, o fígado atua como um importante órgão metabólico. É responsável pela biotransformação de substâncias tóxicas, sejam elas xenobióticos ou compostos endógenos, permitindo sua neutralização e eliminação (GRIJALVA; VAKILI, 2013). Produz a bile, proteínas plasmáticas - como fatores de coagulação e proteínas carreadoras - e ureia (GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015). Além disso, é o principal órgão envolvido na regulação do metabolismo energético corporal. Através da circulação portal, nutrientes absorvidos

pelo intestino após a alimentação têm como destino o fígado, onde são processados e então armazenados ou distribuídos pelo corpo (RUI, 2014). Esse órgão desempenha, portanto, um importante papel na regulação dos fluxos de glicose e lipídeos entre os órgãos durante os períodos de alimentação e jejum (JONES, 2016).

De forma geral, após a alimentação, a glicose proveniente da digestão dos alimentos segue para o fígado, onde entra nos hepatócitos por transporte passivo mediado pelo transportador de glicose GLUT2 e é catabolizada pela via da glicólise gerando energia para os hepatócitos. A glicose excedente é armazenada como glicogênio ou então convertida a triacilgliceróis pelo processo de lipogênese (RUI, 2014). Esses triacilgliceróis são empacotados em lipoproteínas VLDL e, assim como os lipídeos provenientes da alimentação que circulam o sangue em quilomícrons, têm como destino o tecido adiposo – onde são armazenados –, ou o tecido muscular – onde são utilizados como fonte de energia pelo próprio músculo (RUI, 2014).

Durante o jejum, os ácidos graxos, provenientes da quebra dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo, são utilizados pelos hepatócitos como fonte de energia no processo de β -oxidação. O acetil-CoA produzido por essa via é utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo do TCA) para produção de energia. Entretanto, o excesso de acetil-CoA produzido é convertido em corpos cetônicos, os quais são liberados na circulação e utilizados como fonte de energia por outros órgãos. Durante o jejum, o fígado também libera glicose como fonte de energia para o organismo, através da quebra do glicogênio armazenado e do processo de gliconeogênese (RUI, 2014). A glicose sai dos hepatócitos pelo mesmo transportador de entrada, o GLUT2. No período de jejum o fígado é, portanto, uma importante fonte de corpos cetônicos e glicose, utilizados pelo organismo para obtenção de energia.

1.2.1 Metabolismo de Carboidratos

1.2.1.1 Glicólise

A glicólise é o processo de catabolismo de glicose gerando energia para a célula na forma de ATP. Assim, a glicose que chega ao fígado pela veia porta após a alimentação é captada pelos hepatócitos e utilizada para produção de energia que sustenta o funcionamento dessas células (RUI, 2014). Essa via consiste em duas fases. A fase preparatória engloba as 5 primeiras reações e gasta 2 ATP para a

ativação da glicose. A fase de pagamento, por sua vez, engloba as 5 últimas reações e produz 4 ATP, 4 NADH e 2 piruvatos (KIM; DANG, 2005) (**Ilustração 1**).

Todo processo da glicólise envolve, assim, um conjunto de 10 reações que ocorrem no citosol, sendo apenas 3 delas irreversíveis. Essas 3 etapas são importantes pontos de regulação da via e consistem na reação 1 catalisada pela enzima Hexoquinase (Hk), a reação 3 catalisada pela enzima Fosfofrutoquinase (PfkI) e a reação 10 catalisada pela enzima Piruvato Quinase (Pklr) (HAN et al., 2016) (**Ilustração 1**).

O saldo final gerado pela glicólise é, portanto, de 2 ATP, 4 NADH e 2 piruvatos. Na presença de oxigênio o piruvato segue, ainda, para a completa oxidação na mitocôndria através do Ciclo do TCA, o qual gera CO_2 , NADH e ATP. Os elétrons originados dos processos oxidativos da glicólise e ciclo do TCA são carreados por NADH e transferidos para a Cadeia Transportadora de Elétrons formando H_2O e ATP por fosforilação oxidativa. Já na ausência de oxigênio ocorre um processo fermentativo onde o piruvato recebe os elétrons do NADH sendo reduzido a lactato, o que permite a regeneração de NAD^+ da célula para a continuidade dos processos oxidativos (KIM; DANG, 2005).

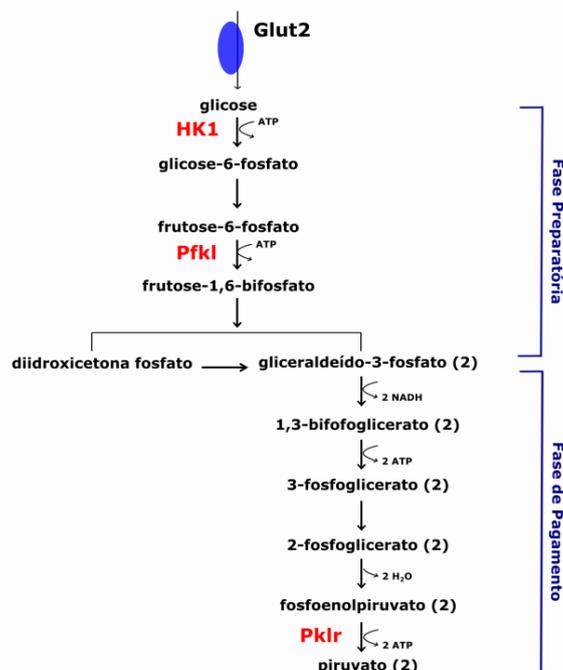


Ilustração 1: Via da Glicólise. A glicólise é o processo de catabolismo de carboidratos gerando ATP, NADH e piruvato. Essa via consiste em 10 reações divididas em duas fases: preparatória e de pagamento. Em destaque, enzimas de reações chave da via. Fonte: do autor.

1.2.1.2 Gliconeogênese

A gliconeogênese consiste na formação de glicose a partir de precursores não-carboidratos como o lactato, piruvato, glicerol, intermediários do Ciclo do TCA e aminoácidos como alanina e glutamina (RUI, 2014). É um processo que ocorre principalmente no fígado e repõe os estoques de glicogênio hepático e a glicose no sangue (ADEVA-ANDANY et al., 2016). A manutenção do fornecimento de glicose é importante, pois alguns órgãos como o cérebro, medula renal, testículos, eritrócitos e tecidos embrionários utilizam a glicose como a principal ou única fonte de energia. Sendo assim, a gliconeogênese é uma importante via durante os períodos de jejum, mas que também permanece ativa durante os períodos de alimentação, porém de forma atenuada.

De suas 10 etapas, 7 consistem na simples reação inversa à que ocorre na glicólise. Entretanto, 3 passos da glicólise são irreversíveis e, para estes, é necessário a utilização de um conjunto diferente de enzimas: Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase (Pck), Frutose-1,6-Bifosfatase (Fbp1) e Glicose-6-Fosfatase (G6pc) **(Ilustração 2)** (ADEVA-ANDANY et al., 2016).

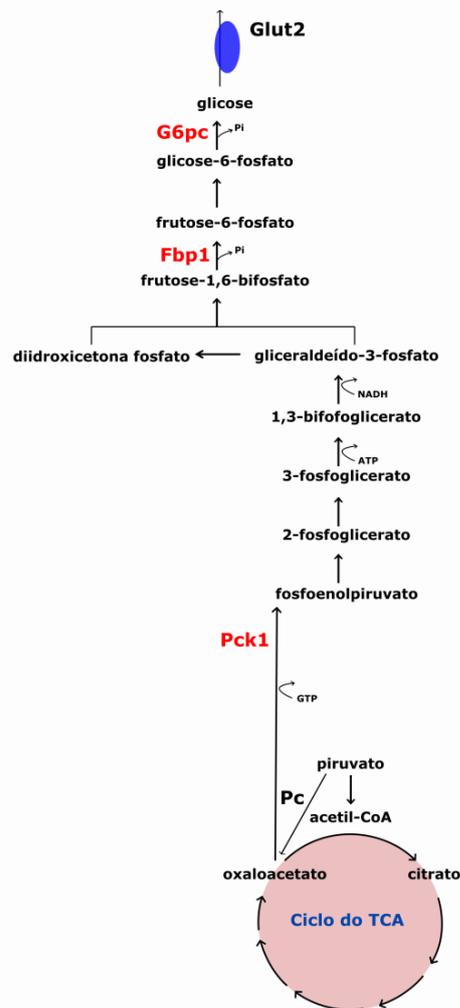


Ilustração 2: Via da Gliconeogênese. A gliconeogênese é o processo de síntese de glicose a partir de precursores não carboidratos. Estão em destaque as enzimas das etapas que se diferenciam da via da glicólise. A gliconeogênese é importante durante os períodos de jejum. Fonte: do autor.

Um importante processo que se relaciona à gliconeogênese é o metabolismo de aminoácidos. Enzimas denominadas aminotransferases são responsáveis pela transferência do grupo amino dos aminoácidos para o α -cetogluturato formando um α -cetoácido e glutamato. Alanina Aminotransferase (ALT), que catalisa a reação alanina + α -cetogluturato = piruvato + glutamato e Aspartato Aminotransferase (AST), que catalisa a reação aspartato + α -cetogluturato = oxaloacetato + glutamato, são exemplos dessas enzimas. Esse processo tem como resultado: 1 - formação de piruvato, pela ALT, e oxaloacetato, pela AST, que seguem para a gliconeogênese sendo, por isso, alanina e aspartato denominados aminoácidos glicogênicos pois podem ser convertidos a glicose e glicogênio; 2 - o grupo amino de diferentes

aminoácidos convergem para a formação de um único produto, o glutamato, que segue para vias de excreção pelo ciclo da ureia. A contribuição dos aminoácidos na gliconeogênese é evidente durante o jejum, onde o músculo libera muita alanina proveniente do metabolismo de proteínas e, no fígado, a alanina é convertida a glicose pelo processo acima descrito e pode retornar a outros órgãos para fornecer energia (LITWACK, 2018).

É importante destacar que ALT e AST são abundantes no citosol hepático e, em caso de injúria, são liberadas dos hepatócitos danificados, alcançando a circulação. Assim, essas enzimas também possuem grande importância clínica pois sua dosagem no soro é uma importante forma, de fácil acesso e baixo custo, para diagnóstico de doenças hepáticas, principalmente quando esta ainda não é sintomática (KIM et al., 2008).

1.2.1.3 Metabolismo de Glicogênio

Nos hepatócitos, a glicose livre em excesso é armazenada através da formação de um polímero, o glicogênio, que será utilizado como uma fonte para o fornecimento rápido de glicose nos períodos de jejum. A maior parte de sua síntese ocorre pela via direta, por meio da glicose derivada da alimentação, mas pode também ocorrer por via indireta, utilizando glicose derivada de gliconeogênese (ADEVA-ANDANY et al., 2016). Para a síntese do glicogênio a enzima Glicogênio Sintase (Gys) transfere resíduos de glicose para as extremidades do glicogênio preexistente, aumentando o polímero (HAN et al., 2016) **(Ilustração 3)**.

Por sua vez, durante o período de jejum, a glicose armazenada pode ser rapidamente liberada dos hepatócitos para outros tecidos através da quebra do glicogênio. Para isso, tem-se a atuação da enzima Glicogênio Fosforilase (Pygl) que remove os resíduos de glicose das extremidades do glicogênio, reduzindo o polímero e liberando as unidades de glicose, que se tornam disponíveis para utilização (HAN et al., 2016) **(Ilustração 3)**. A molécula de glicogênio apresenta ramificações que aumentam sua solubilidade e permitem o aumento do número de extremidades disponíveis para a atuação da glicogênio sintase e fosforilase, tornando o processo de síntese e quebra de glicogênio mais rápido (MANNERS, 1991).

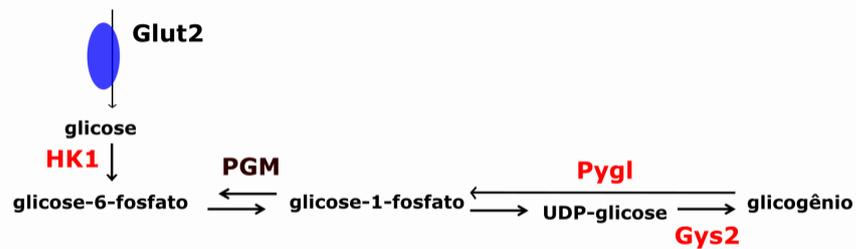


Ilustração 3: Metabolismo de Glicogênio. Durante períodos de alimentação a glicose em excesso é armazenada como um polímero de glicogênio. Em períodos de jejum essa glicose estocada pode ser liberada pela quebra do glicogênio mantendo, assim, o fornecimento de glicose para outros tecidos. Fonte: do autor.

1.2.2 Metabolismo de Lipídeos

1.2.2.1 Transporte de ácidos graxos no plasma sanguíneo

O fígado é responsável pela produção das proteínas plasmáticas albumina, globulina e fibrinogênio. Dentre estas, a albumina é a mais abundante no plasma. Todos os hepatócitos tem capacidade de sintetizar essa proteína, que é rapidamente secretada no plasma, não sendo armazenada nos hepatócitos. Uma vez na corrente sanguínea, a albumina se distribui entre os espaços intravascular e extravascular, passando do plasma para os tecidos e novamente retornando ao plasma. A albumina desempenha importantes funções sendo responsável pelo transporte de substâncias endógenas e exógenas como ácidos graxos, bilirrubina, hormônios, metais e fármacos. Também é responsável pela manutenção da pressão osmótica regulando a distribuição de fluidos entre o sangue e tecidos (ROTHSCHILD; ORATZ; SCHREIBER, 1988).

A alfafetoproteína é membro na família gênica da albumina, sendo considerada o análogo fetal da albumina. É uma proteína plasmática muito abundante, produzida durante o desenvolvimento fetal pelo saco vitelínico e fígado fetal. Assim como a albumina, também se liga e transporta pelo plasma ácidos graxos, bilirrubina, metais e fármacos (MIZEJEWSKI, 2004), mas muito de sua atividade biológica ainda não é clara. Após o nascimento, a transcrição do gene cai rapidamente e o nível dessa proteína em indivíduos adultos é muito baixo, sendo elevado apenas em certas condições fisiológicas (como o caso da persistência hereditária) ou patológicas (em certos tumores como o carcinoma hepatocelular) (SCHIEVING et al., 2014).

1.2.2.2 Captura e Transporte Intracelular de Ácidos Graxos

Em períodos de jejum, ácidos graxos não esterificados (NEFAs) são liberados do tecido adiposo pela quebra de triacilgliceróis armazenados em gotículas lipídicas citoplasmáticas (Gibbons, Islam, e Pease 2000). Os NEFAs são carreados na corrente sanguínea associados à albumina e alcançam os hepatócitos, entrando na célula via difusão ou transportadores de membrana: FATP (Proteína de transporte de ácido graxo) e FAT (Translocase de ácido graxo). NEFAs são então transportados por FABPs (Proteínas de ligação a ácidos graxos) pelo citoplasma celular com destino a diferentes compartimentos celulares (NGUYEN et al., 2008).

FABPs são os equivalentes intracelulares da albumina sérica, uma vez que se ligam a lipídeos (ácidos graxos, colesterol e fosfolipídeos), transportando-os para diferentes locais celulares para seu processamento: gotículas lipídicas para estoque, mitocôndrias e peroxissomos para oxidação, retículo endoplasmático para síntese de membrana, enzimas citosólicas para regulação de sua atividade, núcleo para regulação da transcrição e para fora da célula para sinalização autócrina ou parácrina (**Ilustração 4**) (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008). FABPs também possuem efeito citoprotetor pois protegem o citosol dos efeitos detergentes de ácidos graxos tóxicos, limitam a disponibilidade de heme na participação da produção de ROS protegendo seu grupo ferro-heme altamente reativo e tem papel antioxidante ao promover o *scavenging* de ROS (WANG et al., 2015).

As FABPs são constituídas por nove membros, distribuídos de forma diferencial entre os tecidos. FABP1 está presente nos hepatócitos e se liga a ácidos graxos de cadeia longa (LCFA), acil-CoA graxo, PPAR, prostaglandinas, ácidos biliares, bilirrubina, grupo heme e outros ligantes hidrofóbicos (WANG et al., 2015).

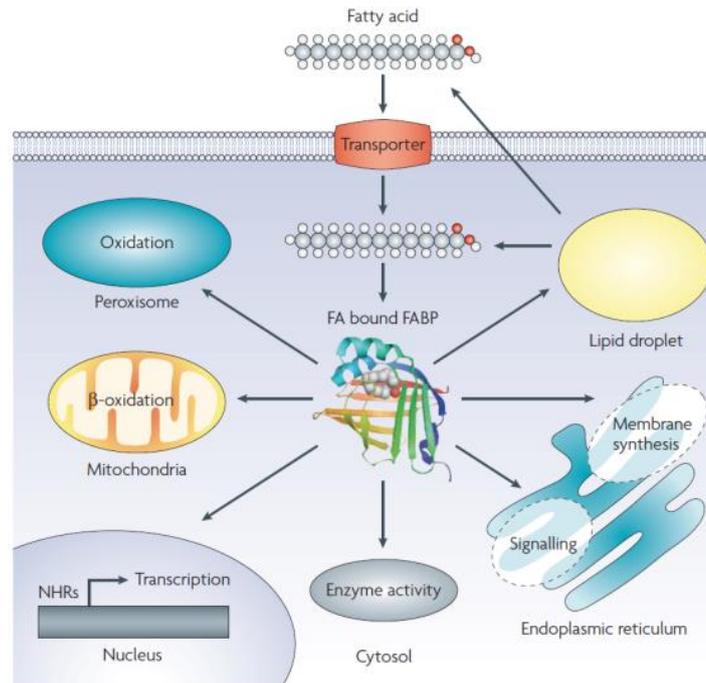


Ilustração 4: Transporte intracelular via FABP. As FABPs se ligam a lipídeos e os transportam para diferentes compartimentos celulares. O destino do lipídeo irá determinar sua função na célula. **Fonte: Furuhashi e Hotamisligil, 2008**

1.2.2.3 Oxidação de Ácidos Graxos

Durante o jejum os ácidos graxos são, assim, liberados de gotículas lipídicas no adiposo e carreados pelo plasma ligados à albumina com destino ao hepatócito. Uma vez dentro dessas células, os ácidos graxos são carreados pelas FABPs até a mitocôndria onde ocorre a oxidação dos ácidos graxos. A oxidação de ácidos graxos é um processo que gera energia para a célula, sendo mais ativo nos hepatócitos durante os períodos de jejum quando o fornecimento de glicose e, conseqüentemente, a glicólise reduzem (RUI, 2014). Para entrar na mitocôndria, local onde ocorre o processo de oxidação, os ácidos graxos de cadeia longa são ativados por acil-CoA sintetases (ACS) presentes na membrana mitocondrial externa. Essa enzima promove a esterificação de um ácido graxo com um CoA formando um acil-CoA graxo. Os acil-CoA graxos são então transportados por um mecanismo envolvendo Cpt e Cact. Carnitina palmitoiltransferase I (CptI) se localiza na membrana mitocondrial externa e forma acil-carnitina pela união de um ácido graxo à carnitina. O carreador carnitina/acilcarnitina (Cact) transporta, então, a acilcarnitina para a matriz mitocondrial em troca de carnitina livre para o espaço intermembranas. Ao final, Carnitina palmitoiltransferase II (CptII), presente na

membrana mitocondrial interna, desliga o ácido graxo e a carnitina e liga novamente um CoA formando um acil-CoA graxo (**Ilustração 5**). Ácidos graxos de cadeia curta passam pela membrana mitocondrial sem a necessidade de um transportador e são ativados por ACS da matriz mitocondrial. Uma vez que os ácidos graxos entraram na matriz mitocondrial, estão comprometidos com a via oxidativa e esse é, portanto, um passo limitante da velocidade de oxidação (NGUYEN et al., 2008; WANDERS et al., 2010).

O acil-CoA, então, entra na via de oxidação de ácidos graxos, ou β -oxidação, onde, em 4 reações, sofre a remoção de 2 carbonos formando acetil-CoA (que segue para oxidação no Ciclo do TCA ou para a produção de corpos cetônicos) e NADH e FADH₂ (que seguem para a cadeia transportadora de elétrons formando ATP). É também formado um ácido graxo reduzido de 2 carbonos que pode entrar novamente na via de oxidação (**Ilustração 5**) (NGUYEN et al., 2008).

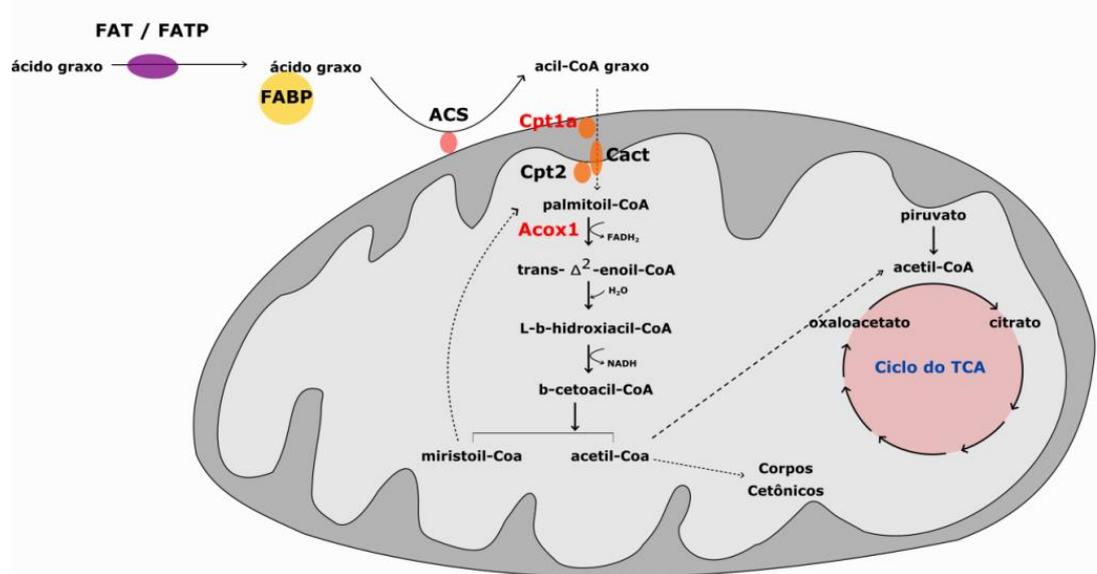


Ilustração 5: Oxidação de Ácidos Graxos. A oxidação de ácidos graxos gera energia para a célula. Os ácidos graxos são transportados para o interior mitocondrial via Cpt1, Cact e Cpt2. O acetil-CoA formado ao final pode seguir para Ciclo do TCA seguido de Cadeia Transportadora de Elétrons ou gerar corpos cetônicos, usados como fonte de energia por outros tecidos. Fonte: do autor.

1.2.2.4 *Biossíntese de Ácidos Graxos*

Quando a célula tem quantidades de carboidrato suficientes para suprir suas necessidades energéticas, o excesso, além de ser armazenado como glicogênio, também pode ser convertido a ácidos graxos para o armazenamento (RUI, 2014). A síntese de ácidos graxos ocorre no citosol a partir de acetil-CoA, fornecido pelo processo oxidativo da glicólise, e transportado para o citosol de forma indireta via citrato (**Ilustração 6**).

A primeira parte do processo consiste na formação de malonil-CoA pela enzima Acetil-CoA carboxilase (Acc). Na segunda parte, a enzima Ácido graxo sintase (Fas) transforma o malonil-CoA em um ácido graxo de 16 carbonos, o palmitato, a partir de um processo com 4 reações (condensação, redução, desidratação e redução) que se repete por 7 vezes (a cada uma com o acréscimo de 2 carbonos na molécula) (SANDERS; GRIFFIN, 2016).

Em uma terceira parte do processo, o palmitato sofre alongação para formar ácidos graxos de cadeias maiores. Essa etapa é realizada por enzimas localizadas no lado citoplasmático do retículo endoplasmático e consiste em um ciclo com as mesmas 4 etapas realizadas pela FAS (condensação, redução, desidratação e redução). Cada etapa, entretanto, é realizada por uma enzima diferente e é importante salientar a atuação da enzima Ácido graxo elongase (Elovl) na primeira reação, a condensação, uma etapa limitante do processo (**Ilustração 6**) (KIHARA, 2012).

A última parte do processo de síntese é a desaturação, ou seja, formação de ligações duplas para obtenção de ácidos graxos insaturados. Essa etapa é realizada por duas famílias distintas de enzimas, as Stearoyl-CoA desaturases (Scd) que inserem uma ligação dupla na posição $\Delta 9$; e as Ácido graxo desaturases (Fads) que inserem uma dupla ligação nas posições $\Delta 6$ e $\Delta 5$ (**Ilustração 6**) (GUILLOU et al., 2010).

Os ácidos graxos sintetizados podem, então, ser utilizados para a síntese de fosfolípídeos, que irão constituir as membranas, e trigliceróis, que armazenam energia. A esterificação de ácidos graxos ao glicerol para formação de trigliceróis envolve a participação das enzimas Monoacilglicerol aciltransferase (MGAT) e Diacilglicerol aciltransferase (DGAT) (NGUYEN et al., 2008). Os triglicerídeos são

transferidos temporariamente para estoques em gotículas lipídicas citoplasmáticas e, depois, liberados nas lipoproteínas VLDL (GIBBONS; ISLAM; PEASE, 2000).

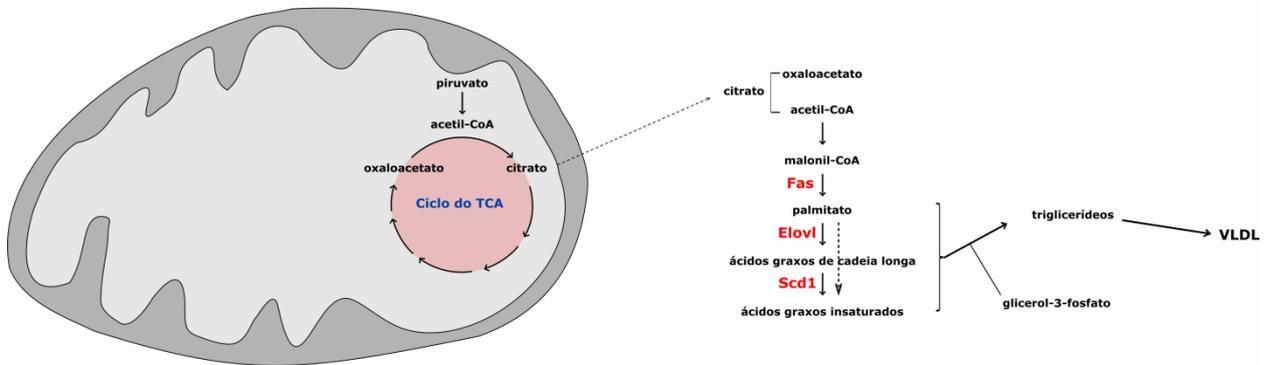


Ilustração 6: Biossíntese de Ácidos Graxos. O excesso de carboidratos também pode ser convertido a ácidos graxos a partir do acetil-CoA formado na glicólise. O processo envolve as enzimas Fas, Elovl e Scd. O ácido graxo ao final forma triglicerídeos que podem ser armazenados em gotículas lipídicas ou liberados nas VLDL. Fonte: do autor.

1.2.2.5 Destinos dos Triglicerídeos: Gotículas Lipídicas

Gotículas lipídicas são estruturas esféricas intracelulares e citoplasmáticas que armazenam lipídeos na célula. São formadas por um centro de lipídeos neutros (triglicerídeos, ésteres de colesterol e compostos xenofóbicos hidrofóbicos) e uma membrana em monocamada constituída de lipídeos polares (fosfolipídeos e colesterol livre) e proteínas associadas (**Ilustração 7**) (THIELE; SPANDL, 2008). Assim, essas estruturas armazenam os triglicerídeos, produzidos pelos hepatócitos, no citoplasma até o momento de exportação. O acúmulo excessivo dessas gotículas nos hepatócitos é um processo danoso e denominado esteatose hepática.

As proteínas associadas às gotículas têm papel estrutural ou função enzimática, atuando na síntese ou degradação de lipídeos e sinalização (ONAL et al., 2017; THIELE; SPANDL, 2008). Dentre as proteínas encontra-se a família PLIN (também denominada PAT em referência a seus membros perilipina, adipofilina e TIP47). Essa família engloba proteínas periféricas com função estrutural e que regulam o acesso de lipases aos lipídeos neutros do centro da gotícula (ONAL et al., 2017). Dentre seus membros encontra-se a Perilipina 2 (PLIN2 ou adipofilina, ou ADRP – proteína relacionada à diferenciação de adipócito). Essa proteína está presente em vários tipos celulares e seus níveis são diretamente proporcionais aos

níveis de lipídeos intracelulares, estimulando a formação das gotículas lipídicas. É a proteína melhor caracterizada na esteatose hepática na qual se encontra aumentada (OKUMURA, 2011).

A degradação dos triacilgliceróis armazenados para liberação de ácidos graxos envolve a ação das lipases ATGL e HSL. No processo, a perilipina é fosforilada e degradada, permitindo o acesso da lipases aos lipídeos neutros (THIELE; SPANDL, 2008).

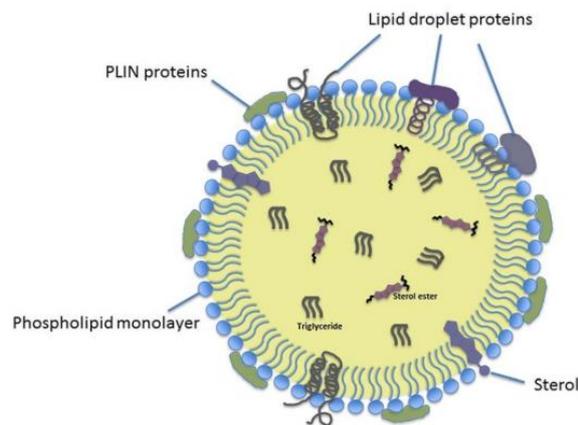


Ilustração 7: Estrutura de gotícula lipídica. No centro das gotículas encontram-se lipídeos neutros como triglicerídeos, ésteres de colesterol e compostos hidrofóbicos. Já a camada externa é formada por lipídeos polares, como fosfolípidos e colesterol livre, e proteínas. **Fonte: Onal, 2017**

1.2.2.6 Destinos dos Triglicerídeos: VLDL

Os triglicerídeos sintetizados pelos hepatócitos são empacotados em lipoproteínas denominadas VLDL que são liberadas na circulação, transportando os triglicerídeos para tecidos como o adiposo e muscular. As lipoproteínas são estruturas que permitem o transporte de lipídeos hidrofóbicos pelo ambiente aquoso do plasma sanguíneo. Constituem-se por um centro hidrofóbico (com triglicerídeos e ésteres de colesterol) e uma membrana hidrofílica (com fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteínas). As apolipoproteínas têm diversas funções sendo importantes para guiar a formação das lipoproteínas, manter a integridade estrutural, se ligar aos receptores de lipoproteínas e, ainda, ativar ou inibir enzimas que metabolizam as lipoproteínas (JIN; MARCHADIER; RADER, 2002) (FEINGOLD, 2018).

A formação de lipoproteínas envolve 3 processos: uma via exógena, uma via endógena e o transporte reverso de colesterol. Pela via exógena, lipídeos ingeridos

na alimentação são digeridos e, nos enterócitos, ocorre a síntese de quilomícrons pela formação de triglicerídeos e ésteres de colesterol e sua união à apolipoproteína Apob48. Os quilomícrons são então liberados nos vasos linfáticos e atingem a circulação sistêmica pelo ducto torácico (FEINGOLD, 2018). A enzima Lipase lipoprotéica (Lpl), presente no endotélio dos capilares, hidrolisa os triglicerídeos dos quilomícrons liberando ácidos graxos que podem ser capturados localmente por células musculares, para obter energia, ou células adiposas, para estoque, ou ainda se associarem à albumina e serem carregadas para outros tecidos (JIN; MARCHADIER; RADER, 2002). Com a perda de triglicerídeos essas lipoproteínas reduzem de tamanho, se tornam enriquecidas em colesterol e adquirem Apoe, passando a ser denominadas remanescentes de quilomícrons (FEINGOLD, 2018). Esses remanescentes são, então, removidos da circulação pelo fígado por meio da ligação de Apoe a receptores de LDL ou receptores LRP (DOSE et al., 2016).

A via endógena, por sua vez, corresponde à síntese de VLDL pelo fígado, a partir de lipídeos da alimentação que chegam a esse órgão ou de lipídeos sintetizados no próprio fígado. As VLDL são, então, liberadas na circulação e, assim como os quilomícrons, sofrem hidrólise por Lpl. Há, assim, a redução dessas lipoproteínas, enriquecimento com colesterol e aquisição de Apoe sendo denominadas agora IDL (FEINGOLD, 2018). IDL também são removidas pelo fígado pelo mecanismo de ligação de Apoe à receptores hepáticos (DOSE et al., 2016). Essas lipoproteínas também podem sofrer hidrólise por Lipase hepática (HL), uma lipase da mesma família das LPL que é sintetizada nos hepatócitos e se encontra localizada nos sinusóides hepáticos. Há a formação, assim, de LDL (JIN; MARCHADIER; RADER, 2002). LDL é uma lipoproteína rica em colesterol e o transporta para os tecidos periféricos, sendo removida da circulação também pelo fígado por receptores de LDL hepáticos (FEINGOLD, 2018).

O transporte reverso de colesterol corresponde ao transporte de colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado. Esse processo é importante pois a maioria das células não possui a capacidade de metabolizar o colesterol. Assim, o fígado é responsável por metabolizar esse lipídeo, convertendo-o em ácidos biliares ou secretando-o na bile (FEINGOLD, 2018). O transporte reverso é realizado pela lipoproteína HDL. Essas lipoproteínas contendo ApoA1 são sintetizadas no fígado e intestino e adquirem colesterol e fosfolipídeos dos tecidos à medida que circulam

pelo sangue, entregando-os ao fígado para metabolização via SR-BI e ApoE (JIN; MARCHADIER; RADER, 2002). O fígado apresenta, assim, um importante papel na dinâmica de lipoproteínas, contribuindo para sua formação e reciclagem ao retirá-las da circulação.

1.2.2.7 Metabolismo de Ácidos Biliares

A conversão de colesterol, insolúvel, em ácidos biliares, solúveis, é a principal via que permite a excreção desses lipídeos. Além de ser um meio de eliminação do colesterol, sua natureza anfipática confere aos ácidos biliares a propriedade de detergente permitindo a formação de micelas no intestino que facilitam a solubilização, digestão e absorção dos lipídeos e vitaminas lipossolúveis e também a formação de micelas na vesícula biliar, que solubilizam o colesterol evitando sua cristalização e formação de pedras (DE AGUIAR VALLIM; TARLING; EDWARDS, 2013).

A síntese de ácidos biliares envolve uma quebra da cadeia lateral carbônica do colesterol, com retirada de 3 carbonos, e modificações nos 4 anéis esteróis, com a adição de grupos hidroxila que dão o caráter hidrofílico à molécula aumentando sua solubilidade (DE AGUIAR VALLIM; TARLING; EDWARDS, 2013). Esse processo pode ocorrer por meio de duas vias. A via clássica ou neutra (75%) é iniciada pela enzima Cyp7a1 e as modificações no anel esteróide precedem a quebra da cadeia lateral. Já a via alternativa ou acídica (25%) é iniciada pela enzima Cyp27a1 e a quebra da cadeia lateral precede as modificações do anel esteróide. Por fim, ocorre a conjugação desses ácidos biliares com glicina ou taurina formando o sal biliar, mais solúvel (**Ilustração 8**). No total, há o envolvimento de 17 enzimas localizadas no citosol, retículo endoplasmático, mitocôndria e peroxissomos (CHIANG, 2013). A bile formada é composta por 85% de água e os 15% restantes se dividem em 67% de sais biliares, 22% de fosfolipídeos, 4% de colesterol, eletrólitos, minerais, proteínas, pigmentos (bilirrubina e biliverdina), sIgA e drogas e metabólitos tóxicos (DE AGUIAR VALLIM; TARLING; EDWARDS, 2013). Transportadores presentes na membrana dos hepatócitos transportam os componentes da bile para o canalículo biliar permitindo sua excreção. Ductos biliares transportam a bile até a vesícula biliar, onde é concentrada, armazenada e liberada para o intestino após a alimentação (CHIANG, 2013).

No intestino, uma pequena parte dos ácidos biliares é convertida por bactérias intestinais em ácidos biliares secundários por meio de desconjugação e dehidroxilação. Os ácidos biliares se dividem, assim, em primários, que incluem CA (ácido cólico), CDCA (ácido xenodeoxicólico) e MCA (α ou β ácidos muricólico, em roedores), e secundários, que incluem DCA (ácido deoxicólico), LCA (ácido litocólico), UDCA (ácido ursodeoxicólico) (DE AGUIAR VALLIM; TARLING; EDWARDS, 2013). Entretanto, a maioria dos sais biliares liberados no intestino é reabsorvida e retorna ao fígado, onde pode ser reciclada, em um processo denominado circulação enterohepática. No hepatócito, os ácidos biliares primários e secundários precisam ser reconjugados com glicina e taurina antes de serem secretados novamente. Essa reconjugação envolve a ativação das cadeias laterais carboxílicas em derivados de CoA, processo catalisado pela enzima BACS (ou Slc27a5) (**Ilustração 8**) (MIHALIK et al., 2002).

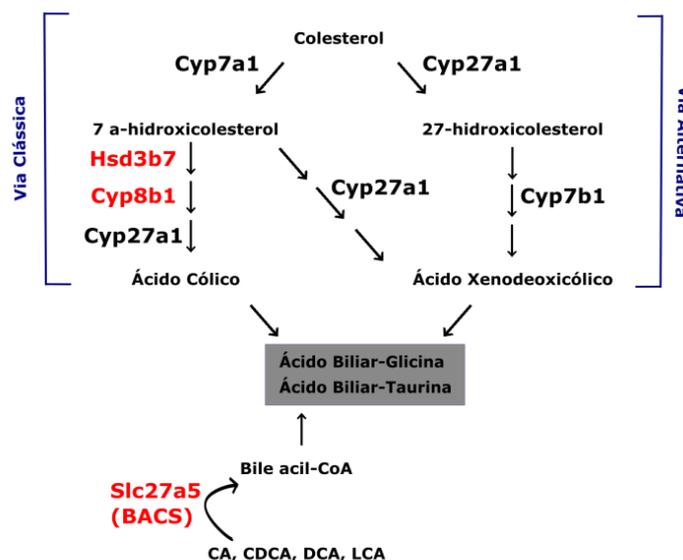


Ilustração 8: Metabolismo de Ácidos Biliares. A formação de ácidos biliares ocorre a partir de modificações na estrutura do colesterol através de uma via clássica ou alternativa. A conjugação dos ácidos biliares aos aminoácidos glicina ou taurina forma os sais biliares. Fonte: do autor.

1.2.3 Metabolismo de Xenobióticos

Xenobióticos são compostos estranhos ao organismo, ou seja, que não são normalmente produzidos ou esperados de existirem nele, como medicamentos ou agentes poluentes. Sua remoção do organismo ocorre pelo metabolismo hepático, o

qual promove uma série de modificações químicas nos compostos tornando-os hidrossolúveis e permitindo, assim, sua excreção na bile ou urina (MOSCOVITZ; ALEKSUNES, 2013).

O metabolismo e as enzimas de eliminação desses compostos se organizam em 3 fases. Na fase I ocorre as reações de ativação do composto como oxidação, redução e hidrólise. Atuam as enzimas Cyp (Citocromo P450), Fmo (Monoxigenase contendo flavina) e Ces (Carboxiesterase). Na fase II ocorre a conjugação de uma molécula endógena solúvel (como ácido glucurônico, sulfato, glicina, glutathiona e acetato) ao xenobiótico, o que aumenta sua solubilidade. Há a atuação de enzimas transferases como Gst (glutathiona-S-transferase), Sult (Sulfotransferase), Ugt (UDP-glucuronosil transferase) e Nat (N-acetil transferase). Por fim, na fase III atuam transportadores que carregam as moléculas do hepatócito para o sinusóide e vice-versa, como o Slc (Carreador de soluto) para captura e o Abc (ATP-binding cassette) para o efluxo (MOSCOVITZ; ALEKSUNES, 2013).

Um exemplo de composto exógeno eliminado pelo fígado é o acetaminofeno (APAP), um anti-inflamatório não esteroide de ampla utilização. A maior parte do APAP sofre glucuronidação, pela ação das enzimas UGT1A1 e UGT1A6, ou sulfatação, pela ação das enzimas SULT1A1, SULT1A3/4 e SULT 1E1, sendo os produtos excretados na urina. Em contrapartida, uma pequena parte é convertida por CYP2E1 a um intermediário reativo, o NAPQI. GST catalisa a ligação do NAPQI à glutathiona reduzida (GSH) permitindo sua excreção na bile. Na overdose de APAP, os estoques de GSH se esgotam e o NAPQI excedente, devido à sua alta reatividade, se liga a proteínas causando danos celulares (MCGILL; JAESCHKE, 2013).

Além do metabolismo de compostos exógenos, essas vias também são responsáveis pelo metabolismo e eliminação de compostos endógenos tóxicos. Um exemplo é a bilirrubina, derivada do metabolismo da hemoglobina pelas células de Kupffer. A bilirrubina, tóxica e hidrofóbica, é convertida a glucuronato de bilirrubina, não tóxico e solúvel, e assim pode ser excretada na bile.

Abaixo, uma visão geral do metabolismo hepático abordado até aqui **(Ilustração 9)**.

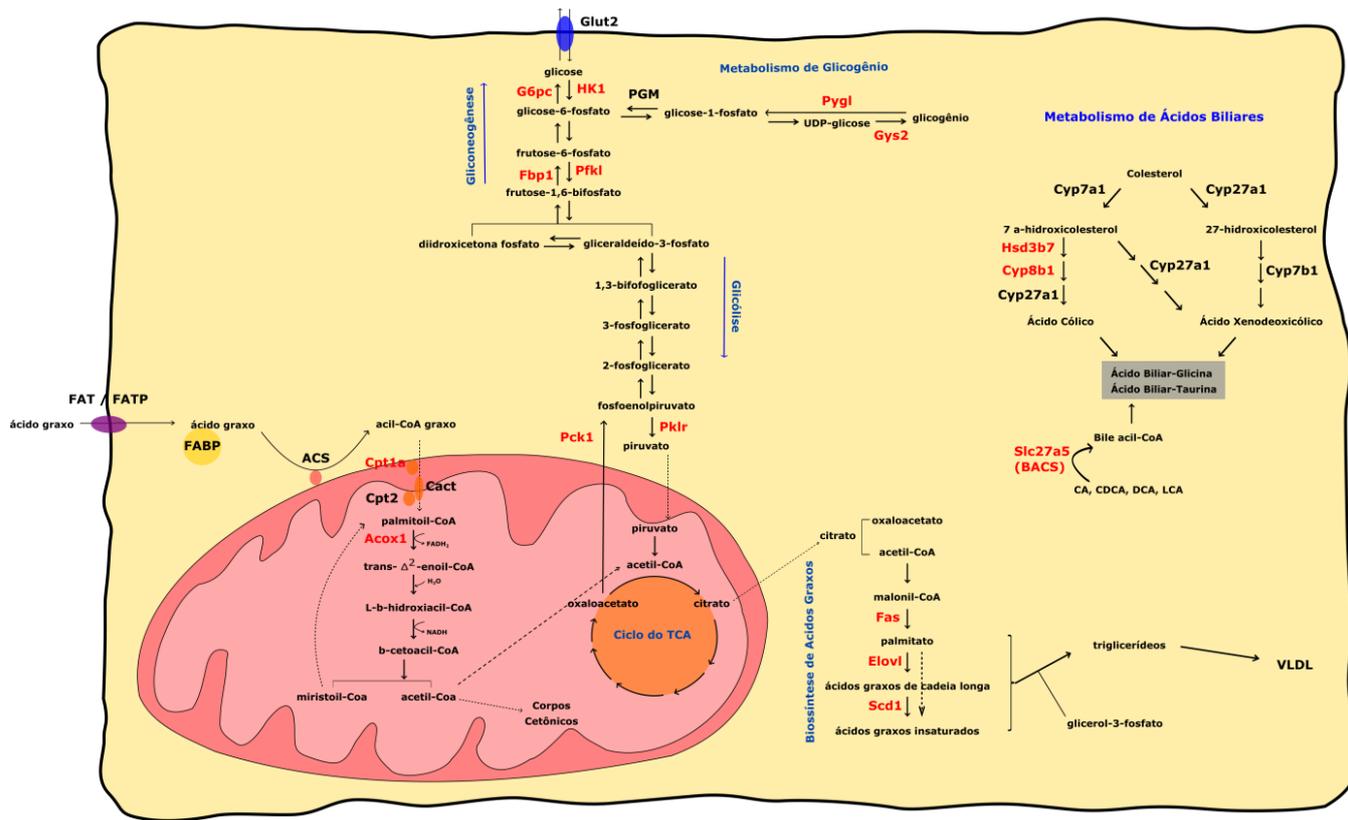


Ilustração 9: Visão geral do metabolismo hepático. No hepatócito estão ativas as vias de glicólise, gliconeogênese, síntese e quebra de glicogênio, oxidação de ácidos graxos, biossíntese de lipídeos, formação de VLDL e gotículas lipídicas, metabolismo de ácidos biliares e detoxificação de compostos xenobióticos. Destacadas em vermelho encontram-se as enzimas que serão avaliadas pelo trabalho. Fonte: do autor.

1.3 Transição hepática neonatal

O fígado realiza diversas funções vitais ao funcionamento e manutenção da homeostase do organismo e sua importância começa já nos primeiros momentos de vida. No desenvolvimento embrionário, o fígado é formado a partir do domínio *foregut* do endoderma definitivo, o qual também dá origem ao pâncreas, estômago, pulmão e tireoide. No dia embrionário E9.0, em camundongos, a região do *foregut* adjacente ao mesoderma cardíaco e septo transversal forma o divertículo hepático, com os hepatoblastos proliferando e invadindo o septo transversal (**Ilustração 10**). Hepatoblastos são células precursoras bipotenciais que apresentam marcadores para hepatócitos (AFP, ALB, HNF4a, CK18), colangiócitos (CK19) e específicos (Dlk1, E-caderina, Liv2, CD24a, Nope, EpCAM). Por volta do dia E13.5 tem início a diferenciação dos hepatoblastos: as células mais próximas à veia porta se

diferenciam em colangiócitos e as células mais distantes se diferenciam em hepatócitos, as principais células constituintes do parênquima hepático. Esse processo de maturação continua ainda pelo período após o nascimento (GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015). Entre os dias E9.5 e E15 o fígado tem papel hematopoiético, sendo o principal sítio de hematopoiese fetal (LEE et al., 2012). Entretanto, à medida que ocorre a diferenciação dos hepatoblastos, o órgão não suporta mais a hematopoiese e estas células migram para a medula óssea ao final da gestação (GRUPPUSO; SANDERS, 2016). Assim, com a diferenciação do hepatócito, a principal função do fígado muda de hematopoiética para metabólica (LI et al., 2009).

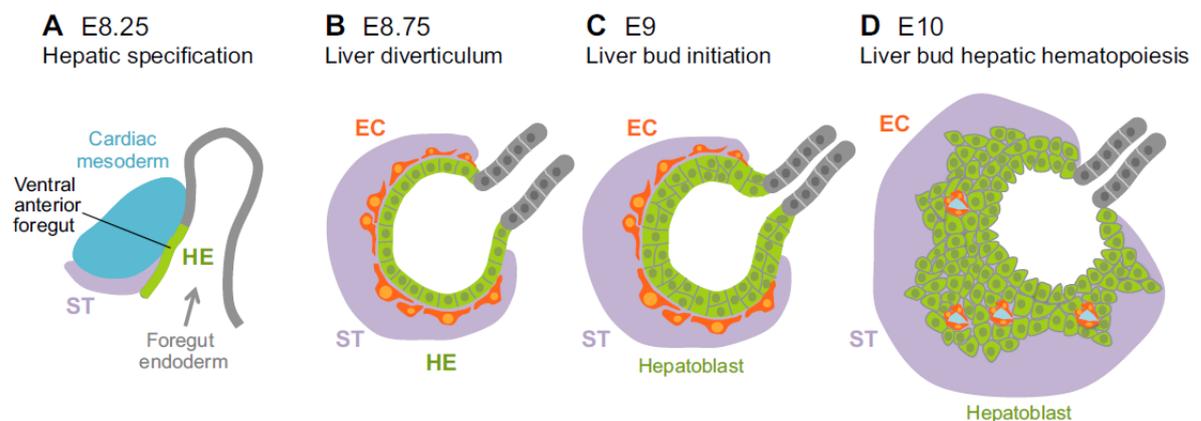


Ilustração 10: Desenvolvimento embrionário hepático. O endoderma hepático, adjacente ao mesoderma cardíaco e septo transversal (ST), prolifera formando hepatoblastos que invadem o ST formando o divertículo hepático. ST: septo transversal; EC: células endoteliais; HE: endoderma hepático. **Fonte: adaptado de Gordillo, 2015**

A transição de um órgão hematopoiético no período fetal para um órgão imuno-metabólico adulto exige um período de mudanças durante a fase neonatal. O nascimento representa um momento em que o indivíduo é exposto a vários desafios sendo essencial uma adequada resposta a eles garantindo a sobrevivência nas novas condições extrauterinas. O fornecimento de nutrientes, antes constantemente ofertado pela mãe via placenta, é abruptamente interrompido e o indivíduo deve ser capaz de manter seus níveis de glicose ativando suas vias de produção e manejando os estoques de glicogênio. Além disso, precisa agora ajustar-se a períodos de jejum e de alimentação e se adaptar a uma alimentação via enteral com a necessidade de absorção de nutrientes (WARD PLATT; DESHPANDE, 2005). Há

também uma grande exposição a novos antígenos via alimentação e colonização da microbiota intestinal, processo que tem impacto também no fígado, já que este órgão recebe produtos microbianos que atravessam a barreira intestinal e chegam via veia porta. Com o nascimento ocorre também uma grande mudança no fluxo de sangue pelo fígado: a veia umbilical, antes responsável pelo maior aporte de sangue ao órgão, agora se atrofia e a veia porta passa a fornecer a maior parte de sangue (DIEHL-JONES; FRASER ASKIN, 2002). Por fim, no período neonatal há duas grandes alterações na fonte alimentar. Durante o período fetal, a nutrição depende exclusivamente dos nutrientes que atravessam a placenta: a glicose atravessa em altas quantidades, sendo a principal fonte de energia fetal, seguida dos aminoácidos, enquanto ácidos graxos livres, colesterol e triglicerídeos passam em apenas pequenas quantidades pela placenta (HERRERA; AMUSQUIVAR, 2000). Com o nascimento, o organismo passa a obter uma dieta rica em gorduras e pobre em carboidratos do leite materno, o oposto do período fetal, no qual recebia altos níveis de carboidrato e pouco lipídeo (HERRERA; AMUSQUIVAR, 2000). Após o desmame, a fonte alimentar passa a ser principalmente composta de carboidratos.

Além desses desafios, o fígado neonatal também passa por remodelamento em sua estrutura. Em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa observamos grande retenção de células imunes no parênquima hepático no período neonatal e hepatócitos menos frequentes, desorganizados, menores e ainda não bem desenvolvidos, não sendo possível a identificação histológica da morfologia clássica do fígado, com cordões de hepatócitos entremeados por sinusoides (NAKAGAKI et al., 2018). **Essas observações nos levaram às perguntas: como se encontra a capacidade metabólica do fígado no desenvolvimento neonatal até adulto? As alterações morfológicas se refletem na função metabólica desempenhada pelos hepatócitos? E em que momento o fígado adquire sua função clássica de órgão metabólico?**

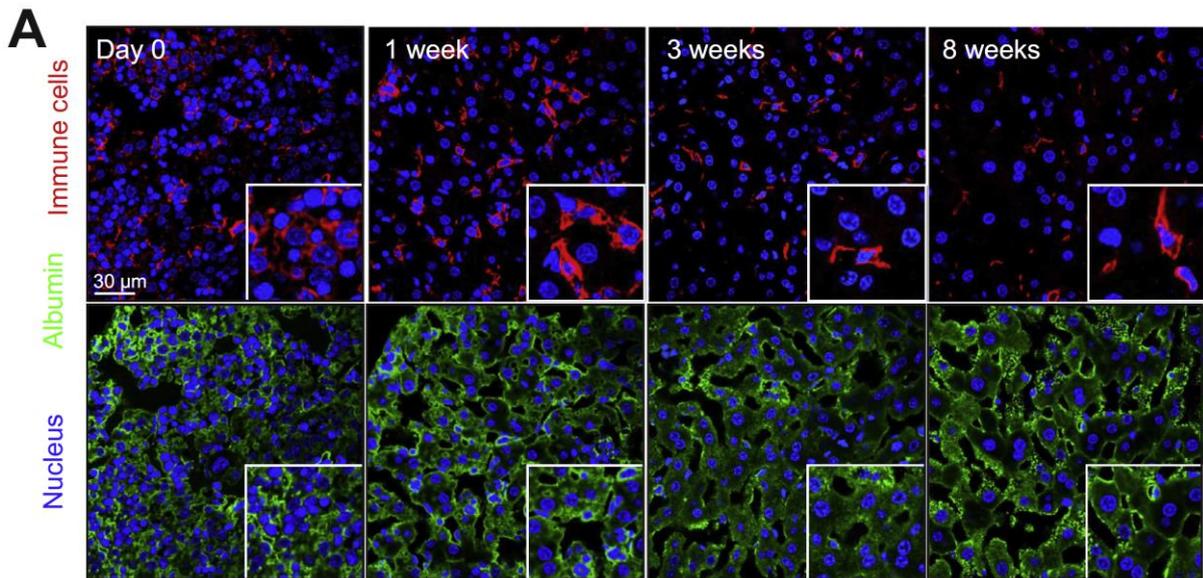


Ilustração 11: Arquitetura hepática no desenvolvimento neonatal. O fígado de neonatos apresenta uma organização morfológica diferente do adulto, com hepatócitos menores, sem clara delimitação e não organizados em cordões. Ainda é alta a retenção de células imunes no órgão. Imunofluorescência de cortes congelados de fígado. Albumina (verde) corando hepatócitos, DAPI (azul) evidenciando núcleos e um coquetel de anticorpos (vermelho) para células imunes. **Fonte adaptado de Nakagaki, 2018.**

2. JUSTIFICATIVA

O fígado fetal e adulto, como demonstrado anteriormente, são bem caracterizados e estudados. O fígado adulto tem importante função metabólica. Entretanto, o mesmo não ocorre com o fígado fetal, tendo pouco papel no metabolismo e sendo principalmente um órgão com função hematopoiética (YANAGIDA et al., 2015). Assim, espera-se que o fígado deva passar por várias mudanças na transição fetal - adulto. Porém esse período de transição neonatal ainda é negligenciado.

No período neonatal são necessárias, assim, uma série de adaptações metabólicas para que o neonato garanta sua sobrevivência no meio extrauterino e adquira a capacidade metabólica do órgão maduro. Entender como ocorrem essas mudanças metabólicas e como alterações no curso desse desenvolvimento inicial podem impactar nos indivíduos adultos são importantes para o melhor entendimento de doenças crônicas como diabetes, obesidade, resistência a insulina e esteatose hepática e permitem a adoção de medidas adequadas de nutrição neonatal. O presente trabalho teve como objetivo, assim, avaliar o metabolismo hepático no período neonatal, observando se esses processos se encontram desenvolvidos no recém-nascido, e sua dinâmica no início da vida frente às mudanças na alimentação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Descrever e caracterizar a dinâmica da função metabólica hepática ao longo do desenvolvimento neonatal até a fase adulta, assim como possíveis alterações neste processo frente a desafios nutricionais (desmame precoce).

3.2. Objetivos específicos

1. Mensurar a função hepática ao longo do desenvolvimento através da capacidade hepática de depurar o corante verde de indocianina;
2. Caracterizar e quantificar cronologicamente a distribuição de lipídeos hepáticos utilizando fragmentos de fígado *ex vivo* corados com Bodipy em microscópio confocal;
3. Criar um banco de amostras de RNA total do fígado – e posteriormente de hepatócitos isolados - de camundongos em diferentes idades durante o desenvolvimento normal e de camundongos desmamados precocemente para análises futuras;
4. Avaliar a dinâmica de expressão de diferentes genes envolvidos no metabolismo hepático através de PCR em tempo real (qRT-PCR) ao longo das idades em condições normais e frente a desafios nutricionais (desmame precoce).

4. METODOLOGIA

4.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 provenientes do biotério do Center for Gastrointestinal Biology (CGB), Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Animais de diferentes idades (0 e 4 dias, 1, 2, 3, 4, 8 semanas) foram gerados de matrizes formadas por 2 fêmeas para cada macho e acondicionadas em microisoladores de polipropileno (ALESCO®) com livre acesso à ração autoclavada (Nuvilab) e água filtrada, em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h/12h). Os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas da Comissão de Ética de Uso Animal da UFMG (CEUA 34/2017).

4.2. Delineamento Experimental

Foram utilizados dois grupos experimentais: um grupo controle, com animais desmamados na terceira semana de vida – idade convencional de desmame, e um grupo de desmame precoce, com animais desmamados na segunda semana de vida (**Ilustração 12 e 13**). Foram avaliadas as idades de 0 e 4 dias e 1, 2, 3, 4 e 8 semanas. No grupo controle, os animais de 0 a 3 semanas foram mantidos juntos à mãe até o momento do experimento. Para as idades de 4 e 8 semanas, foi feito o desmame na terceira semana, separando-se os animais da mãe e acondicionando-os em gaiolas com até 5 animais. No grupo com desmame precoce, os animais de 0 a 2 semanas foram mantidos junto à mãe até o momento do experimento. Para as idades de 3, 4 e 8 semanas, foi feito o desmame na segunda semana, separando-se os animais da mãe e acondicionando-os em gaiolas com até 5 animais.

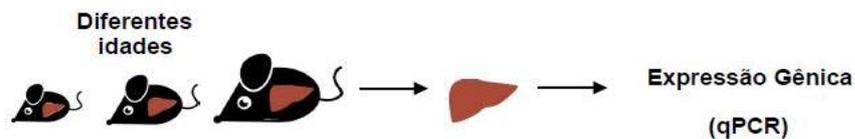


Ilustração 12: Delineamento experimental do grupo controle. A expressão de genes metabólicos hepáticos foi avaliada por qPCR em diferentes idades do desenvolvimento. Neste grupo, os animais foram desmamados com 3 semanas de vida. Fonte: do autor.

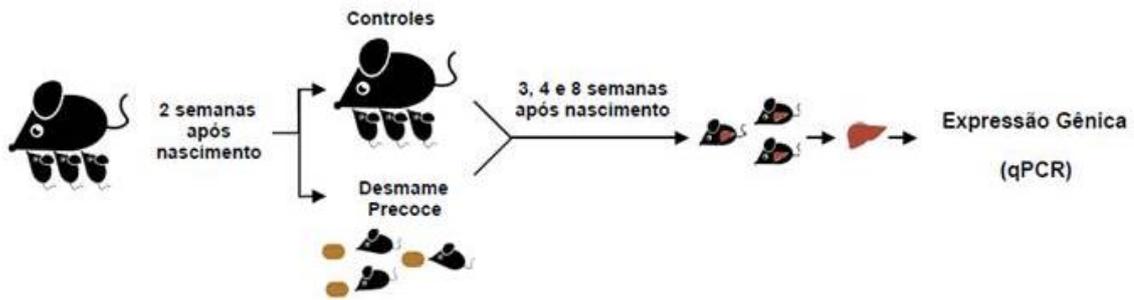


Ilustração 13: Delineamento experimental do grupo desmame precoce. A expressão de genes metabólicos hepáticos foi avaliada por qPCR em diferentes idades do desenvolvimento. Neste grupo, os animais foram desmamados com 2 semanas de vida. Fonte: do autor.

4.3. Teste de depuração do verde de indocianina (cardiogreen)

A avaliação da função hepática foi realizada por meio da depuração do verde de indocianina do sangue (**Ilustração 14**). Os animais receberam via intravenosa (*i.v.*) uma solução de 20 mg/Kg do corante (ICG – *cardiogreen*, Sigma Aldrich) diluído em água tipo I. Após 10 minutos, os animais foram anestesiados, exsanguinados para coleta do soro e então eutanasiados. As amostras de soro foram diluídas em água tipo I e a absorbância medida em 800nm em leitor de microplacas (Versa Max Microplate reader). O resultado obtido foi comparado a uma curva padrão e expresso em $\mu\text{g} / \text{mL}$.



Ilustração 14: Teste de função hepática. O funcionamento do fígado é testado pela sua capacidade em realizar o *clearance* do corante verde de indocianina da circulação. Quanto menor a função do fígado, mais tempo o corante permanece na circulação. Fonte: do autor.

4.4. Avaliação de estoque lipídico no fígado por Microscopia Confocal *ex vivo*

Os animais receberam uma dose via i.v. do anticorpo anti-CD31 BV-421 (0,15 µg/g, clone 390, BD®) para evidenciar os vasos. Após 10 min os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico via i.v. e submetidos à cirurgia para remoção do fígado. O lobo maior do órgão foi posicionado sobre a lamínula de placa adaptada para o uso no microscópio e corado com Bodipy (1mg/mL) para evidenciar as gotículas lipídicas. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1 (Nikon, Japão) e analisadas com o auxílio do software NIS-Elements (Nikon, Japão). As imagens foram quantificadas em relação à porcentagem da área ocupada pela fluorescência emitida pelo Bodipy.

4.5. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (qPCR)

Um total de 5 animais de cada idade foi eutanasiado por sobredose de Ketamina (80 mg/kg; Syntec) e Xilazina (15 mg/kg; Syntec) via i.v., sendo então submetidos a cirurgia para remoção do fígado. Foram removidos pequenos fragmentos de cada lobo do órgão, totalizando 20 mg, a fim de se evitar possíveis variações da expressão de genes metabólicos entre os diferentes lobos de um mesmo órgão. A retirada das amostras foi normalizada para o mesmo horário da manhã a fim de se evitar variações do metabolismo relacionadas ao período do dia e ao estado alimentar. Os fragmentos do fígado foram, então, utilizados para o processo de extração de RNA.

4.5.1. Extração de RNA total do fígado

A extração de RNA total do fígado foi realizada com o auxílio do kit *ReliaPrep™ RNA TissueMiniprep System, Promega®* e seguindo o protocolo do fabricante. Brevemente, os fragmentos retirados do fígado, juntamente com 500 µL de tampão de lise (fornecido pelo kit), foram homogeneizados em macerador de tecidos. Esse procedimento permite a ruptura das células, liberando o RNA na solução, enquanto o tampão de lise inativa as RNases endógenas liberadas durante esse processo, protegendo, assim, o RNA da degradação enzimática. A esta etapa, segue-se centrifugação a 14000 x g por 3 minutos. Ao sobrenadante, foi adicionado 170 µL de isopropanol para precipitação do RNA. A solução foi então transferida para uma minicoluna, seguido de centrifugação a 14000 x g por 1 minuto, o que promove a adsorção dos ácidos nucleicos à coluna. Após lavagem com 500 µL de

RNA Wash Solution a 14000 x g por 1 minuto, o líquido do tubo coletor foi descartado e 30 µL de DNase foram adicionados à coluna para degradação do DNA. Após 15 minutos, seguiu-se 3 etapas de lavagens para retirada de sais, proteínas e outros componentes celulares (adição de Column Wash Solution, RNA Wash Solution e centrifugações). Por fim, o RNA foi desligado da coluna pela adição de 30 µL de Nuclease-free Water, seguido de centrifugação a 14000 x g por 1 minuto, e coletado em microtubos de polipropileno Eppendorf®. O RNA obtido foi quantificado em NanoDrop®, com leitura em 260nm, e armazenado até o uso em freezer -80°C.

4.5.2. Síntese de cDNA

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) ao RNA obtido na extração, foi utilizado o *iScript cDNA Synthesis Kit, BioRad®*. O processo consiste na síntese de uma fita de DNA complementar à fita de RNA por meio do uso de uma enzima transcriptase reversa do vírus MMLV (Moloneymurine leucemia vírus) e uma mistura de primers oligo(dT) e random. Para uma reação de 20 µL foram adicionados em um microtubo de polipropileno Eppendorf® 4 µL do 5x iScriptReaction Mix, 1 µL da transcriptase reversa, 1µg da amostra de RNA e água nuclease-free q.s.p 20 µL. As amostras seguiram, então, para o termociclador *Rotor-Gene Q, QIAGEN®* onde permaneceram por 5 min a 25 °C para anelamento dos primers, 20 min a 46 °C para ação da enzima transcriptase reversa, e 1 min a 95 °C para inativação da enzima. As amostras foram, então, armazenadas a -20 °C para posterior análise por qPCR.

4.5.3. PCR quantitativo (qPCR)

4.5.3.1 Controle endógeno

Os genes endógenos (ou constitutivos) contribuem para a manutenção das funções celulares básicas e, sendo assim, devem ser expressos constantemente em todas células de um organismo. No PCR em tempo real, estes servem como padrão normalizador para a análise das variações de expressão dos genes testados. Nas amostras obtidas, foram testados 4 genes endógenos: RPL4, ACTB, SDHA e GAPDH. O gene expresso mais uniformemente, com baixa variação entre as amostras, foi o GAPDH, sendo este, então, escolhido como o gene normalizador.

4.5.3.2 Determinação da expressão gênica

A reação de qPCR foi realizada utilizando-se 5 µL de *iTaq Universal SYBR Green Supermix BioRad®*, 2 µL de água nuclease-free, 1 µL de cada iniciador (5uM) e 1 µL de cDNA diluído 1:10 (5ng). Para os controles negativos, seguiu-se os

mesmos passos sem a adição de cDNA. O volume final de cada reação foi de 10 µL. As amostras seguiram, então, para o termociclador *Rotor-Gene Q*, *QIAGEN®* passando por um passo inicial de 30 segundos a 98 °C para a ativação da enzima polimerase, seguido de 5 segundos a 95 °C para desnaturação e, então, 60 °C por 30 segundos para anelamento e extensão. As etapas de desnaturação e anelamento/extensão se repetiram por 40 ciclos. Ao final, é realizado o *melting*, partindo da temperatura de 65 até 95 °C, com aumento de 0,5°C a cada 5 segundos.

As sequências dos iniciadores para os genes relacionados estão indicadas no **Quadro 1**.

Nome	Sequência	Fornecedor
<i>Acox1</i> - Acil-CoA Oxidase 1	F: TAACTTCCTCACTCGAAGCCA R: AGTTCCATGACCCATCTCTGTC	IDT
<i>ACTB</i> – Beta actina	F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG R: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	IDT
<i>Apoa1</i> - Apolipoproteína A1	F: GGCACGTATGGCAGCAAGAT R: CCAAGGAGGAGGATTCAAACCTG	IDT
<i>ApoE</i> - Apolipoproteína E	F: CTGACAGGATGCCTAGCCG R: CGCAGGTAATCCCAGAAGC	IDT
<i>Afp</i> - Alfa-fetoproteína	F: CTTCCCTCATCCTCCTGCTAC R: ACAAACTGGGTAAAGGTGATGG	IDT
<i>Alb</i> - Albumina	F: TGCTTTTTCCAGGGGTGTGTT R: TTAICTCCTGCACTAATTTGGCA	IDT
<i>Cpt1a</i> - Carnitina Palmitoiltransferase 1a	F: CTCCGCCTGAGCCATGAAG	IDT

	R: CACCAGTGATGATGCCATTCT	
<i>Cyp8b1</i> – Citocromo P450 8b1	F: CCTCTGGACAAGGGTTTTGTG R: GCACCGTGAAGACATCCCC	IDT
<i>Elovl3</i> - Ácido Graxo Elongase 3	F: TTCTCACGCGGGTTAAAAATGG R: GAGCAACAGATAGACGACCAC	IDT
<i>Fabp1</i> - Proteína de Ligação a Ácidos Graxos 1	F: ATGAACTTCTCCGGCAAGTACC R: CTGACACCCCCTTGATGTCC	IDT
<i>Fasn</i> - Ácido Graxo Sintase	F: GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT R: TGGGTAATCCATAGAGCCCAG	IDT
<i>Fbp1</i> - Frutose-1,6-Bisfosfatase	F: CACCGCGATCAAAGCCATCT R: AGGTAGCGTAGGACGACTTCA	IDT
<i>Gapdh</i> – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	IDT
<i>Got1(AST)</i> - Aspartato Aminotransferase	F: GCGCCTCCATCAGTCTTTG R: ATTCATCTGTGCGGTACGCTC	IDT
<i>Gpt2 (ALT)</i> – Alanina Aminotransferase	F: AACCATTCACTGAGGTAATCCGA R: GGGCTGTTTAGTAGGTTTGGGTA	IDT
<i>Gstp1</i> - Glutationa S-Transferase P1	F: ATGCCACCATACACCATTGTC R: GGGAGCTGCCCATACAGAC	IDT
<i>Gys2</i> - Glicogênio		IDT

Sintase 2	F: ACCAAGGCCAAAACGACAG R: GGGCTCACATTGTTCTACTTGA	
<i>G6pc</i> - Glicose-6-Fosfatase	F: CGACTCGCTATCTCCAAGTGA R: GTTGAACCAGTCTCCGACCA	IDT
<i>Hk1</i> - Hexoquinase 1	F: CGGAATGGGGAGCCTTTGG R: GCCTTCCTTATCCGTTTCAATGG	IDT
<i>Hsd3b7</i> - 3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 7	F: GGGAGCTGCGTGTCTTTGA R: GTGGATGGTCTTTGGACTGGC	IDT
<i>Lrp10</i> - Proteína Relacionada com o Receptor de LDL 10	F: GGATCACTTTCCACGTTCTG R: GAGTGCAGGATTAATGCTCTGA	IDT
<i>Lpl</i> - Lipase Lipoprotéica	F: GGGAGTTTGGCTCCAGAGTTT R: TGTGTCTTCAGGGGTCCTTAG	IDT
<i>Pck1</i> - Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase 1	F: CTGCATAACGGTCTGGACTTC R: CAGCAACTGCCCGTACTCC	IDT
<i>Pfkl</i> - Fosfofrutoquinase	F: GGAGGCGAGAACATCAAGCC R: CGGCCTTCCCTCGTAGTGA	IDT
<i>Pklr</i> - Piruvato Quinase	F: TCAAGGCAGGGATGAACATTG R: CACGGGTCTGTAGCTGAGTG	IDT
<i>Plin2</i> - Perilipina 2	F: GACCTTGTGTCCTCCGCTTAT R: CAACCGCAATTTGTGGCTC	IDT

<i>Pygl</i> - Glicogênio Fosforilase	F: GAGAAGCGACGGCAGATCAG R: CTTGACCAGAGTGAAGTGCCAG	IDT
<i>RPL4</i> – Proteína ribossomal L4	F: CAATCCAAAACGGAGCTTTGTC R: GTAGCACACTATTGTCCTGCC	IDT
<i>Scd1</i> - Stearoyl-CoA Desaturase	F: TTCTTGCGATACTCTGGTGC R: CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT	IDT
<i>SDHA</i> – Complexo da succinato desidrogenase, subunidade A	F: GCGGTGGTCACCTTGATCC R: CCTCTGTAGAAGCGTCTGAATG	IDT
<i>Slc27a5</i> - Carreador de Solute 27a5	F: CTACGCTGGCTGCATATAGATG R: CCACAAAGGTCTCTGGAGGAT	IDT
<i>Ugt1a1</i> - UDP Glucuronosiltransferase 1a1	F: GCTTCTTCCGTACCTTCTGTTG R: GCTGCTGAATAACTCCAAGCAT	IDT
<i>Ugt1a6</i> - UDP Glucuronosiltransferase 1a6	F: GTTTCTCTTCTAGTGCTTTGGG R: CCTCGTTCACTGAGATGTTCTAC	IDT

Quadro 1: Sequência dos iniciadores dos genes analisados por qPCR. Estão indicadas as sequências dos iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) de cada gene analisado por qPCR.

A quantidade relativa dos produtos de PCR foi determinada baseada nos valores de Ct (*threshold cycle*) através do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando-se a idade de 0 dia como controle. Assim, pode-se avaliar se os genes estão mais ou menos expressos nas idades analisadas em relação ao nível de expressão do animal em seu primeiro dia após nascimento. Avaliou-se, também, a curva de *melting* como

forma de comprovar a especificidade da reação, amplificação e a ausência de formação de produtos resultantes do anelamento inespecífico dos *primers*.

4.6. Quantificação da atividade de ALT e AST por ensaios enzimáticos

Para determinar a atividade das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST) no fígado, foram utilizados os kits transaminase ALT e AST cinéticos (Bioclin), respectivamente. Para os testes, 50 mg de tecido foram homogeneizados em salina em macerador de tecidos e centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi utilizado como amostra. Os testes consistem em duas reações, em que primeiramente as enzimas catalisam reações de transferência de grupamentos aminas, gerando produtos que reagem com o NADH oxidando-o a NAD⁺. A velocidade de diminuição da concentração de NADH é proporcional à atividade das transaminases. As medidas foram feitas como quatro leituras de absorbância a 340 nm, em intervalos de um minuto, cujo valor médio reflete a atividade da enzima. O resultado final (dado por U/L) foi dividido pelo peso inicial do tecido, sendo então expresso em U/L/mg.

4.7. Análise dos Dados

A análise estatística e elaboração dos gráficos foi realizada com o auxílio do *software* GraphPad Prism 6. Foi utilizado o método estatístico One-way ANOVA com 95% de confiança para as análises do grupo desmame normal onde a idade de 0 dia é o controle e o método *teste t de student* com 95% de confiança para as análises comparativas entre uma mesma idade do desenvolvimento normal e do desmame precoce.

5. RESULTADOS

5.1. A função depurativa hepática é menor até a segunda semana após o nascimento

O estado funcional do fígado pode ser avaliado pela sua capacidade de depurar o corante verde de indocianina (FAYBIK; HETZ, 2006). Quanto menor a função do fígado, mais tempo o corante permanece na circulação. Assim, o primeiro passo do trabalho foi avaliar a função hepática. Pode-se observar que o fígado possui menor capacidade de depuração do corante nas idades de 0 dia (0d) até 2 semanas após o nascimento (2s), ou seja, nesse período o fígado possui menor capacidade funcional (**Figura 1**).

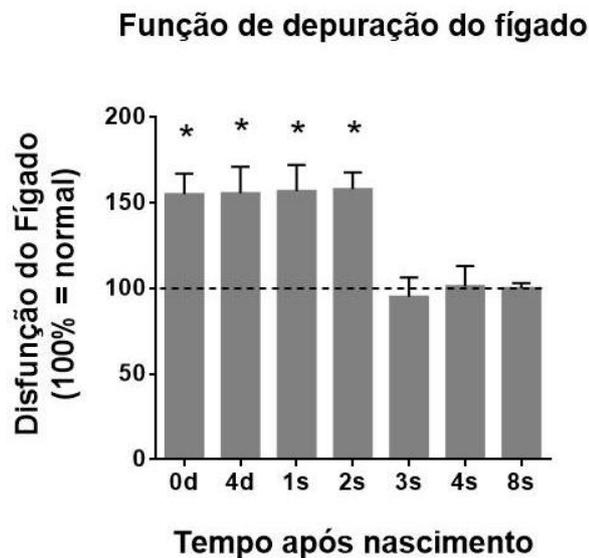


Figura 1: Função hepática ao longo do desenvolvimento. Avaliação da função hepática através de sua capacidade de depuração do corante verde de indocianina da circulação. Número de animais por grupo ≥ 5 . * indica significância estatística em relação ao 8 semanas ($p < 0,05$).

5.2 Há maior acúmulo de lipídeos no fígado até a primeira semana após o nascimento

Gotículas lipídicas são estruturas que armazenam lipídeos no citoplasma hepático até sua exportação ou utilização pelo hepatócito. O acúmulo excessivo de gotículas, entretanto, constitui um processo danoso denominado esteatose. A deposição de gotículas lipídicas no fígado pode ser visualizada por microscopia confocal utilizando-se coloração específica por Bodipy. Observou-se acúmulo de gotículas até a primeira semana de vida (1s), com redução gradual na segunda (2s) e terceira semanas (3s). O acúmulo de gordura chega a valores mínimos na quarta semana (4s), sofrendo um leve aumento novamente no indivíduo adulto (8s) (**Figura 2**). O fígado neonatal, portanto, apresenta cerca de 8 vezes mais gordura até a primeira semana (1s) em relação ao fígado adulto (8s), e reduz os níveis de deposição lipídica na terceira semana de vida (3s) atingindo os níveis do adulto (8s).

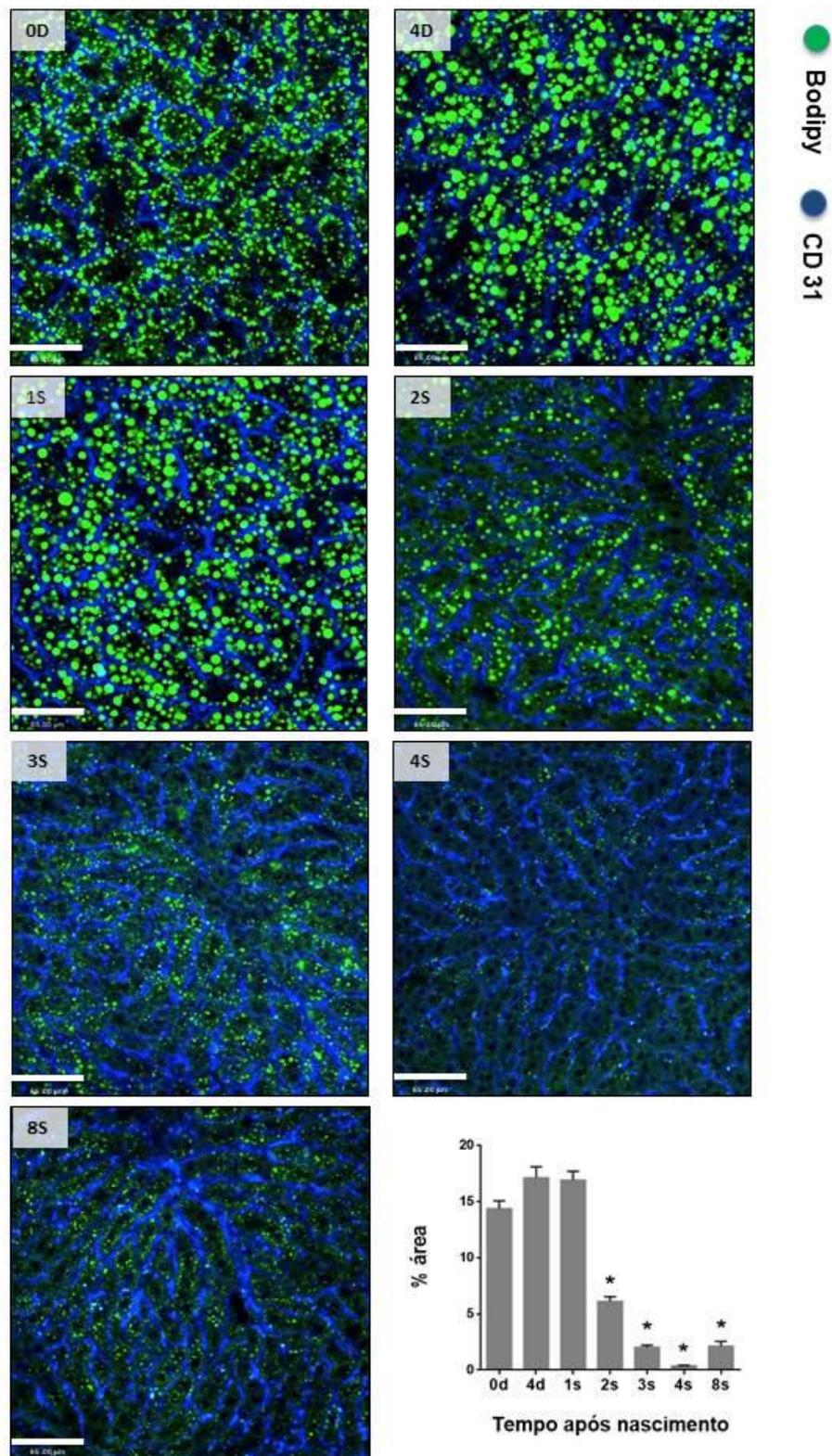


Figura 2: Microscopia confocal mostra acúmulo de lipídeos hepáticos ao longo do desenvolvimento. Fígado fresco observado *ex vivo* em microscopia confocal e corado por anti-CD31 (azul) evidenciando os vasos e Bodipy (verde) evidenciando as gotículas lipídicas. $N \geq 5$ animais por grupo. Campos contados por animal ≥ 5 . A barra de escala representa 65 μm .

5.3. O perfil de expressão gênica sugere menor atividade metabólica do fígado nos estágios iniciais do desenvolvimento pós-natal

Após a caracterização metabólica do fígado em relação ao seu estado funcional e acúmulo microscópico de lipídeos, realizamos uma avaliação molecular do perfil de expressão de genes que codificam enzimas envolvidas em diversas vias metabólicas por meio de PCR em tempo real. Utilizou-se a idade de 0 dia (0d) como controle, permitindo a descrição dos resultados como uma maior ou menor expressão de um gene específico em relação ao dia 0 do nascimento. Obteve-se, assim, a evolução de expressão ao longo do tempo.

5.3.1 Metabolismo de Glicose

Para o metabolismo de glicose, avaliou-se 3 vias: glicólise, gliconeogênese e metabolismo de glicogênio. A glicólise é o processo de catabolismo da glicose que gera energia para o hepatócito, sendo predominante nos períodos pós-alimentação. Das 10 enzimas que participam do processo, Hk1, Pfk1 e Pk1r são especialmente importantes por serem pontos de regulação da atividade da via. Nos genes relacionados à glicólise, observou-se uma redução na expressão de Hexoquinase 1 (Hk1) ao longo do desenvolvimento, com as idades de 3, 4 e 8 semanas diferindo significativamente do tempo de 0 dia (**Figura 3A**). Fosfofrutoquinase (Pfk1) não apresentou diferença de expressão ao longo das idades analisadas (**Figura 3B**). Em relação à Piruvato Quinase (Pk1r), observa-se aumento da expressão ao longo do desenvolvimento, apesar de diferença estatística apenas nos tempos de 4 dias (4d) e 4 semanas (4s) (**Figura 3C**).

Glicose é produzida pelo hepatócito por meio do processo de gliconeogênese. A via consiste, basicamente, no processo inverso ao da glicólise, com exceção de 3 pontos onde participam um conjunto diferente de enzimas, sendo elas Pck1, Fbp1 e G6pc. Os genes envolvidos na gliconeogênese Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase 1 (Pck1), Frutose-1,6-Bisfosfatase (Fbp1) e Glicose-6-Fosfatase (G6pc), apresentam aumento na expressão ao longo do tempo, com Fbp1 e G6pc apresentando um aumento já na semana 1 (1s), que se mantém nas outras idades, e Pck1 com um aumento mais gradual, sendo expressivo apenas na semana 4 (4s) (**Figura 3D, E, F**).

O excesso de glicose é armazenado no hepatócito pela formação do polímero de glicogênio, o qual serve como uma fonte para rápida liberação de glicose nos

períodos de jejum. O gene que codifica a enzima Glicogênio Sintase 2 (Gys2), envolvida na síntese de glicogênio, apresentou leve aumento de expressão a partir do dia 4 (4d) que se manteve até a vida adulta (**Figura 3G**). Entretanto o gene que codifica a Glicogênio Fosforilase (Pygl), enzima responsável pela quebra da molécula de glicogênio e consequente liberação de resíduos de glicose, apresentou aumento mais pronunciado da expressão ao longo do desenvolvimento - principalmente a partir do tempo de duas semanas (2s), onde é 4 vezes maior em relação ao 0d - até a idade adulta, onde é 8 vezes maior (**Figura 3H**).

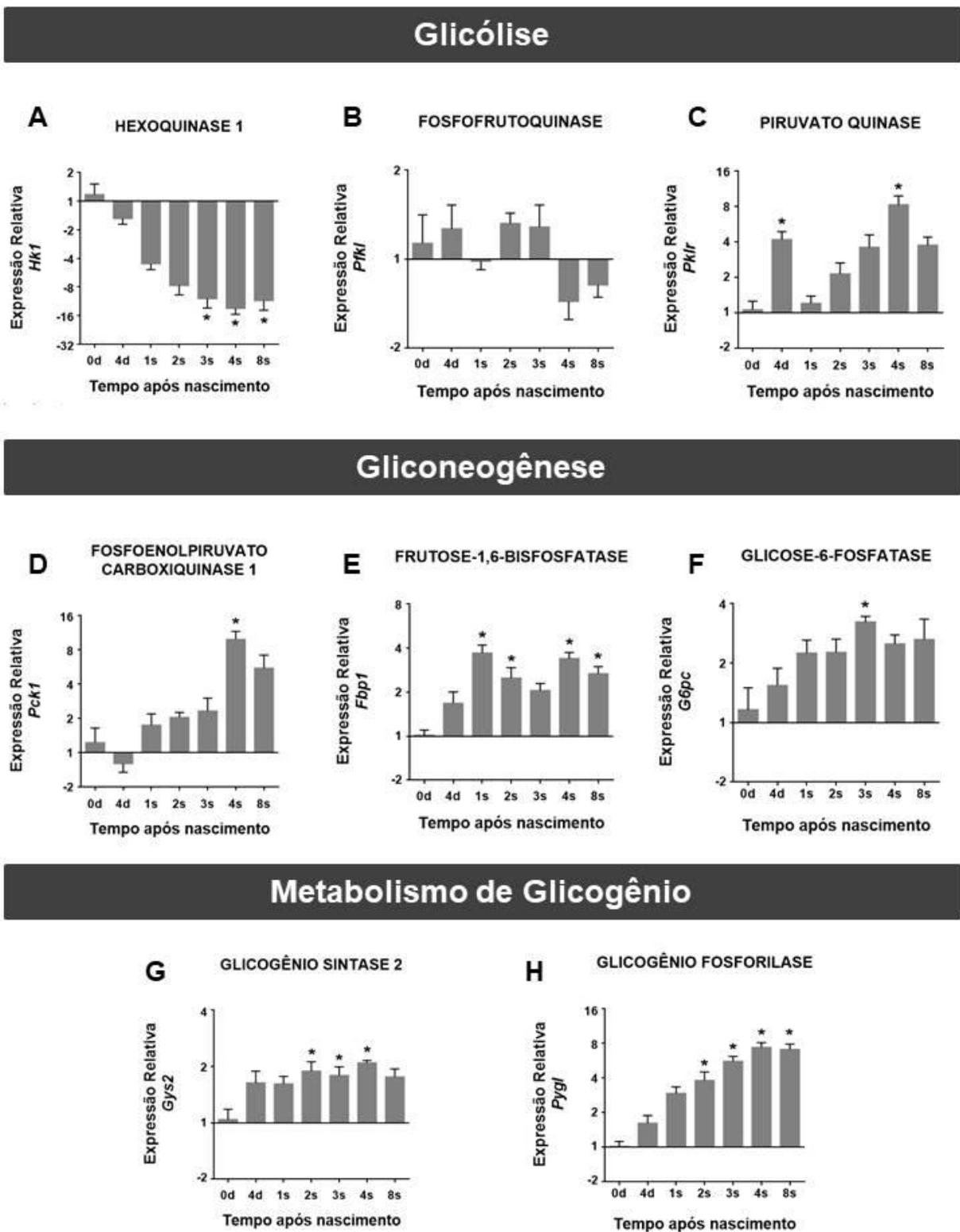


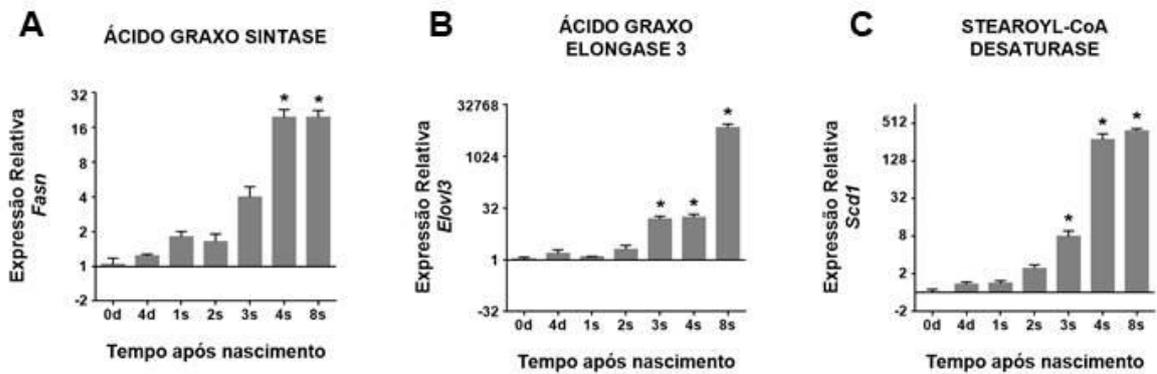
Figura 3: Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos ao longo do desenvolvimento. Expressão relativa de genes das vias de glicólise (A, B, C), gliconeogênese (D, E, F) e metabolismo de glicogênio (G, H) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. *indica diferença estatística em relação à idade de 0 dia (ANOVA; $p < 0,05$).

5.3.2 Metabolismo de Lipídeos

O fígado é um importante local de manejo da disponibilidade de lipídeos. A síntese de ácidos graxos ocorre nos períodos pós-alimentação e cria uma reserva lipídica para os momentos de necessidade energética. Esses lipídeos sintetizados são brevemente estocados em gotículas lipídicas citoplasmáticas até a exportação pelas VLDL que distribui os lipídeos por outros órgãos para armazenamento ou utilização. Genes envolvidos na síntese de ácidos graxos como Ácido Graxo Sintase (Fasn), Ácido Graxo Elongase 3 (Elovl3) e Stearoyl-CoA Desaturase (Scd1) encontram-se menos expressos nas idades iniciais do desenvolvimento até, aproximadamente, a segunda semana de idade (2s). A partir do tempo de 2s há grande aumento na expressão de Fasn, Elovl3 e Scd1, chegando, no adulto, a cerca de 16, 7000 e 380 vezes, respectivamente (**Figura 4A, B, C**).

Ácidos graxos também são utilizados como fonte de energia para o hepatócito através do processo de oxidação. Em relação aos genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, a Carnitina Palmitoiltransferase 1a (Cpt1a) apresentou aumento da expressão a partir da semana 1 (1s), que se manteve até a semana 4 (4s) seguida de pequena redução no adulto (8s), ainda que a expressão não tenha sido estatisticamente diferente (**Figura 4D**). A Acil-CoA Oxidase 1 (Acox1), por sua vez, apresentou um aumento gradual de expressão ao longo das idades, sendo significativo nas semanas 4 (4s) e 8 (8s) com uma expressão 4 vezes maior em relação ao dia de nascimento (0d) (**Figura 4E**).

Síntese de Ácidos Graxos



Oxidação de Ácidos Graxos

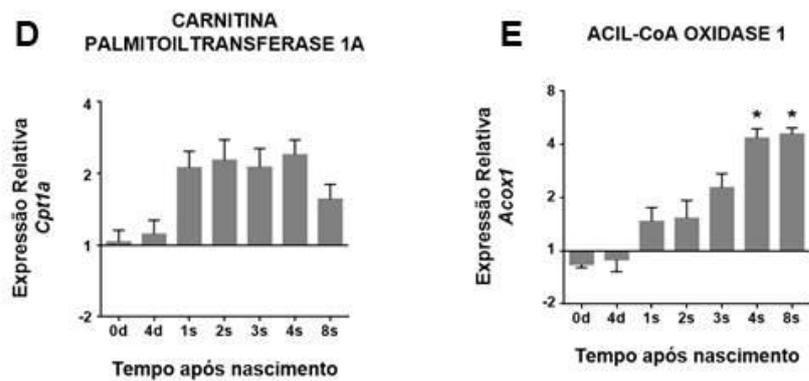


Figura 4: Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos ao longo do desenvolvimento. Expressão relativa de genes de síntese de ácidos graxos (A, B, C) e oxidação de ácidos graxos (D, E) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. *indica diferença estatística em relação à idade de 0 dia (ANOVA; $p < 0,05$).

O fígado também apresenta importante papel na dinâmica de lipídeos pelo organismo, ajudando na formação de lipoproteínas que carregam lipídeos para outros órgão ou promovendo a retirada dessas lipoproteínas da circulação pela interação de receptores a apolipoproteínas da estrutura. Em outros genes também relacionados ao metabolismo de lipídeos, como Apolipoproteína E (ApoE), Apolipoproteína A1 (ApoA1), Proteína Relacionada com o Receptor de LDL 10 (Lrp10) e Proteína de Ligação a Ácidos Graxos 1 (Fabp1), observou-se, novamente, aumento na expressão dos genes ao longo do desenvolvimento, principalmente nos tempos mais tardios de 2s a 8s (**Figura 5A, B, C, D**). O aumento na expressão de Lipase Lipoprotéica (Lpl) foi observado apenas nos tempos de 1 a 4 semanas e a Perilipina 2 (Plin2) apresentou discreto aumento da expressão apenas na idade adulta (8s) (**Figura 5E, F**).

Proteínas Relacionadas ao Metabolismo de Lipídeos

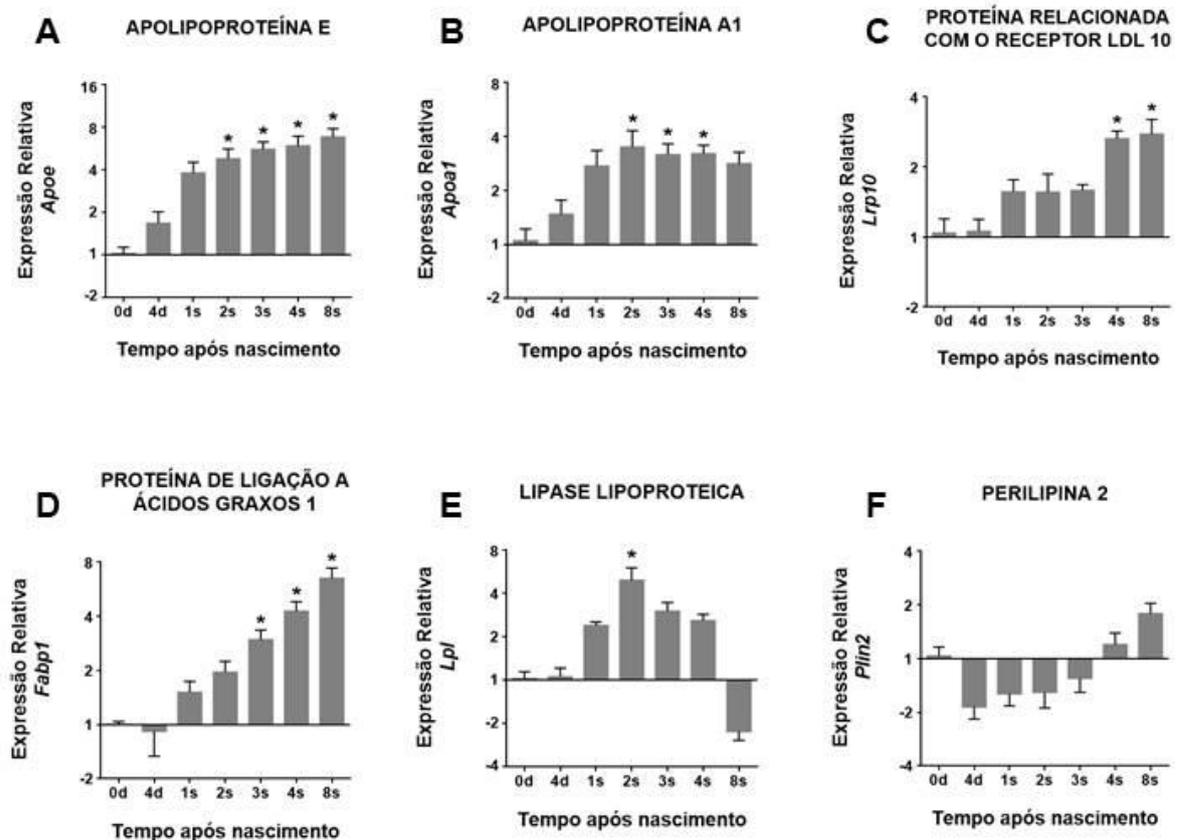


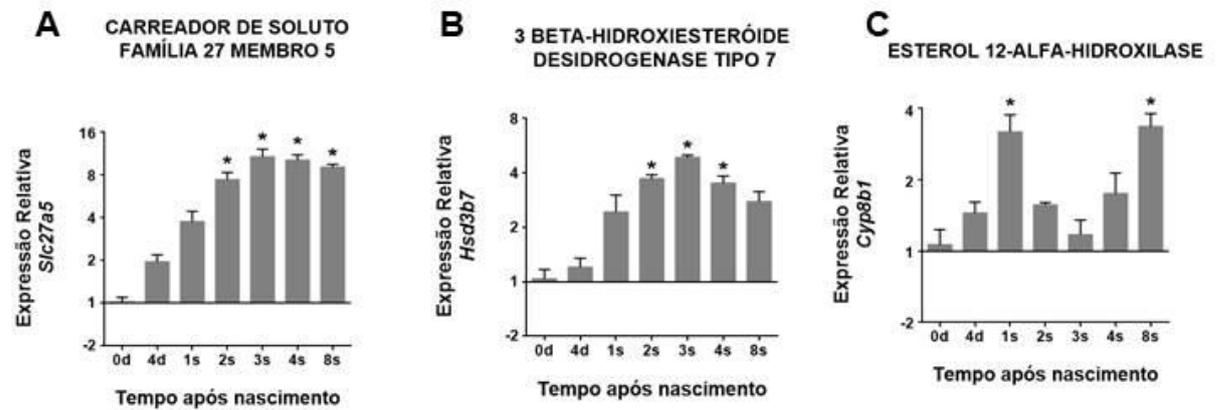
Figura 5: Expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos ao longo do desenvolvimento. Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos (A-F) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. *indica diferença estatística em relação à idade de 0 dia (ANOVA; $p < 0,05$).

5.3.3 Metabolismo de Ácidos Biliares e Xenobióticos

Ácidos biliares são moléculas anfipáticas produzidas pelo fígado que, além de funcionarem como uma via para eliminação de colesterol, também promovem a emulsificação de gotículas lipídicas no trato gastrointestinal facilitando sua digestão. Genes envolvidos na síntese de ácidos biliares, como o Carreador de Solute 27a5 (Slc27a5) e 3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 7 (Hsd3b7), apresentam menor expressão nas idades iniciais de 0 dia (0d) e 4 dias (4d) e um aumento gradual de expressão ao longo do desenvolvimento, começando na semana 1 (1s) e se tornando significativamente diferente a partir da semana 2 (2s) (**Figura 6A, B**). Para a Esterol 12-alfa-hidroxilase (Cyp8b1) observou-se apenas aumentos pontuais nas idades de uma semana (1s) e oito semanas (8s) (**Figura 6C**).

O fígado também é um importante local de eliminação de substância tóxicas como compostos xenobióticos. O nível de RNAm de genes que codificam para enzimas do metabolismo de xenobióticos, Glutathione S-Transferase P1 (Gstp1), UDP Glucuronosiltransferase 1a6 (Ugt1a6) e UDP Glucuronosiltransferase 1a1 (Ugt1a1), também apresentam expressão que se eleva ao longo do desenvolvimento (**Figura 6D, E, F**).

Síntese de Ácidos Biliares



Metabolismo de Xenobióticos

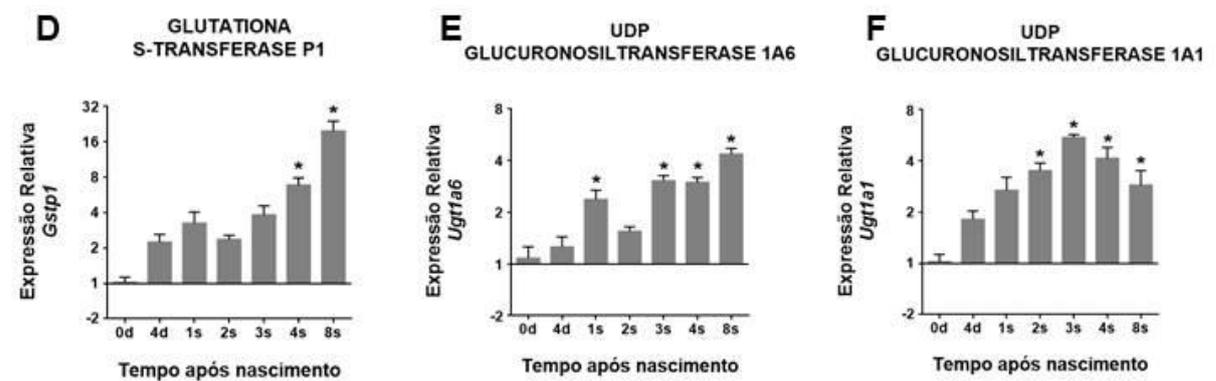


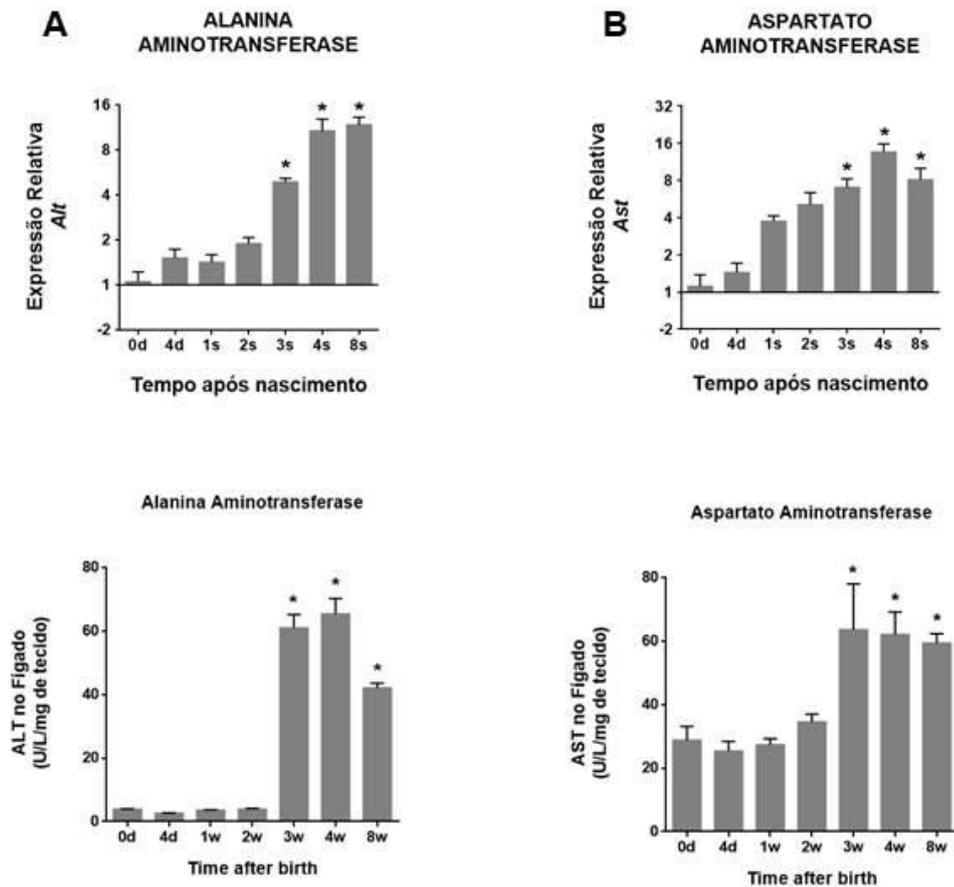
Figura 6: Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos biliares e xenobióticos ao longo do desenvolvimento. Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo de ácidos biliares (A, B, C) e ao metabolismo de xenobióticos (D, E, F) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. *indica diferença estatística em relação à idade de 0 dia (ANOVA; $p < 0,05$).

5.3.4 Proteínas Plasmáticas e Aminotransferases

As aminotransferases são enzimas que promovem a entrada de aminoácidos na gliconeogênese. Além disso, tem importante função clínica pois podem ser detectadas no soro em caso de lesão hepática. A Alanina Aminotransferase (Alt) apresentou menor expressão de RNAm entre as idades de 0 dia (0d) a 2 semanas (2s), com aumento em 3s, 4s e 8s. A Aspartato Aminotransferase (Ast), por sua vez, apresentou menor expressão de RNAm até o quarto dia de vida (4d), com aumento na expressão já na semana 1 (1s) que se torna estatisticamente significativo nas semanas 3, 4 e 8. O padrão de expressão de RNAm foi confirmado pela avaliação da atividade das enzimas no fígado (**Figura 7A, B**).

Avaliou-se, também, o nível de expressão de RNAm para duas proteínas carreadoras produzidas pelo fígado e encontradas no plasma sanguíneo. A albumina é a proteína plasmática mais abundante e é responsável pelo transporte de substâncias como ácidos graxos, bilirrubina e fármacos. O gene que codifica a albumina apresentou menor nível de expressão em 0d, com aumento já a partir do dia 4 (4d) (**Figura 7C**). A Alfa-fetoproteína é o análogo do período fetal da albumina. Seu gene apresentou perfil de expressão inverso, com redução da expressão a partir de 2s, chegando a 32000 vezes menos em 8s (**Figura 7D**).

Aminotransferases



Proteínas Carreadoras

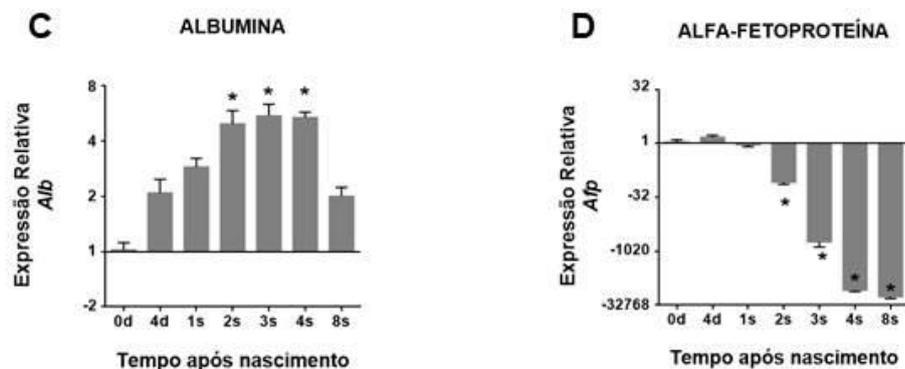


Figura 7: Expressão gênica de aminotransferases e proteínas carreadoras ao longo do desenvolvimento. Expressão relativa de aminotransferases (A, B) e proteínas carreadoras produzidas pelo fígado (C, D) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. O padrão de expressão de *Alt* e *Ast* foi confirmado pelas dosagens da atividade destas enzimas no fígado. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. *indica diferença estatística em relação à idade de 0 dia (ANOVA; $p < 0,05$).

O padrão de expressão de todos os genes nas diferentes idades foi reunido em um heatmap, no qual a variação da expressão de genes pode ser visualizada por uma variação de cores do azul (genes menos expressos) ao vermelho (genes mais expressos) (**Figura 8**). Durante o desenvolvimento neonatal observa-se que grande parte dos genes metabólicos apresentam um padrão geral de menor expressão gênica nas idades iniciais do período pós-natal, principalmente nas idades de 0 dia (0d) a uma semana (1s). O padrão de expressão dos genes se eleva ao longo do desenvolvimento e atinge os níveis encontrados na idade adulta com cerca de 3 semanas de idade (3s). Várias vias do metabolismo hepático, assim, apresentam um programa de desenvolvimento lento e a aquisição do perfil metabólico do fígado ocorre, portanto, em tempos mais tardios, próximo ao período do desmame na

semana 3 (3s), quando o perfil de expressão gênica se torna similar ao adulto.

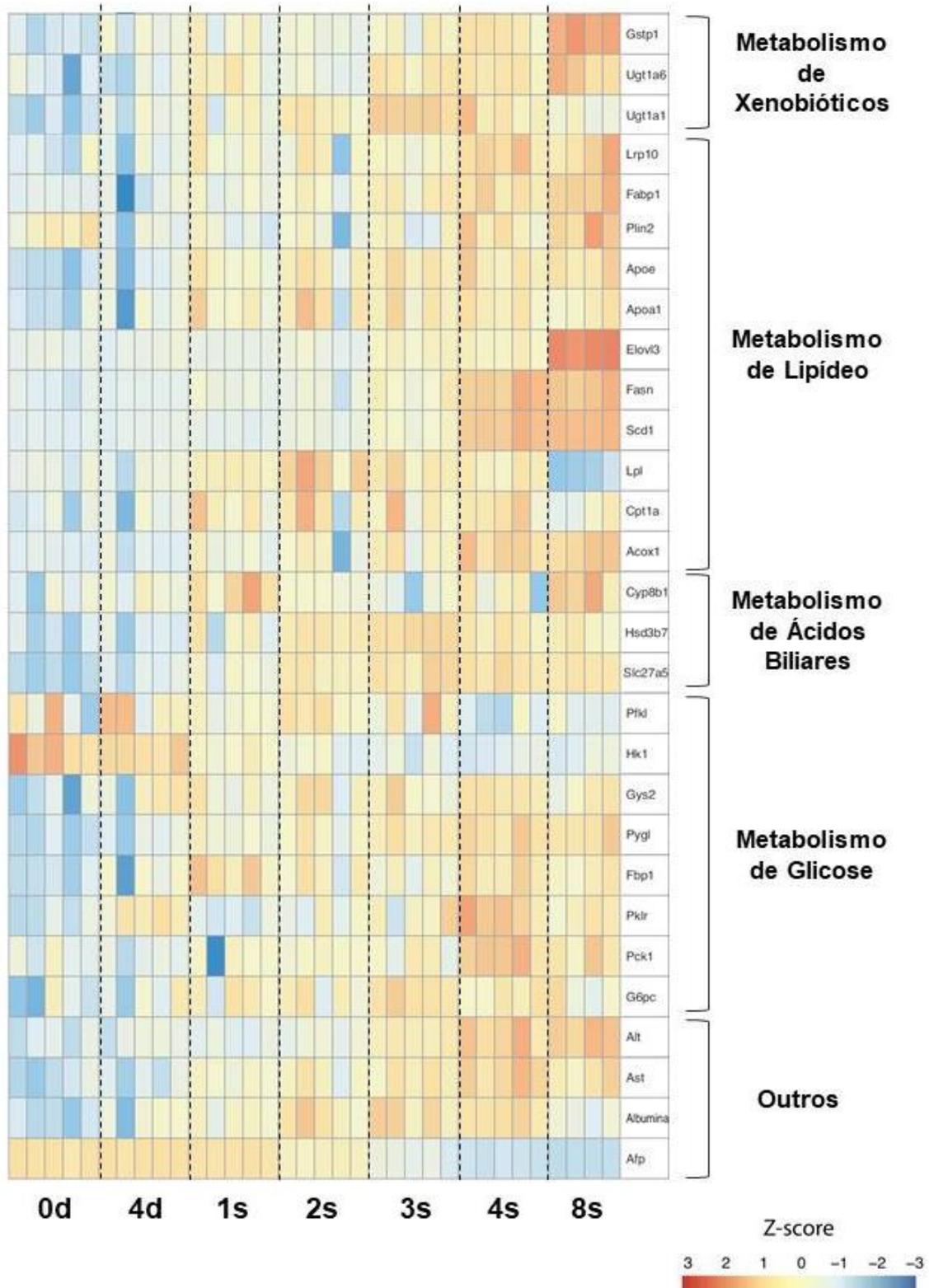


Figura 8: Expressão gênica do metabolismo hepático durante o desenvolvimento normal. Representação em heatmap de 29 genes pertencentes a vias do metabolismo hepático avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo.

5.4. O desmame precoce altera a expressão de genes relacionados ao metabolismo

No perfil de expressão de vários genes ao longo do desenvolvimento, observou-se menor expressão de genes metabólicos nas idades iniciais e o aumento dessa expressão com o desenvolvimento. O nível de expressão do RNAm de enzimas metabólicas atinge níveis semelhantes ao do adulto aproximadamente na terceira semana de vida. Como o desmame dos animais ocorre nesta idade de 3 semanas, nos perguntamos se as alterações alimentares poderiam estar guiando o desenvolvimento metabólico hepático. Para isso, realizamos o desmame precoce dos animais, com duas semanas de idade, ou seja, uma semana antes da idade normal, e avaliamos o efeito desse desmame prematuro nas mesmas vias analisadas anteriormente.

Buscamos, primeiramente, acompanhar a resposta dos animais ao evento de desmame precoce. A avaliação do peso é uma medida direta da resposta dos animais à substituição do leite pela alimentação sólida. Acompanhamos, assim, a evolução de peso até uma semana após o desmame precoce. Enquanto os animais controle apresentaram ganho de peso entre as idades de 16 a 21 dias, os animais desmamados precocemente perderam peso até a idade de 18 dias, mas recuperaram o peso nas idades posteriores (**Figura 9**). Observa-se, assim, perda de peso inicial provavelmente pela troca de alimentação em um momento onde o animal ainda não tem habilidade de lidar com essa nova fonte nutricional. Entretanto, essa perda de peso é pequena em relação ao grupo controle e superada, com o animal prosseguindo seu desenvolvimento normal, demonstrando que este foi capaz de lidar com o desafio do desmame precoce.

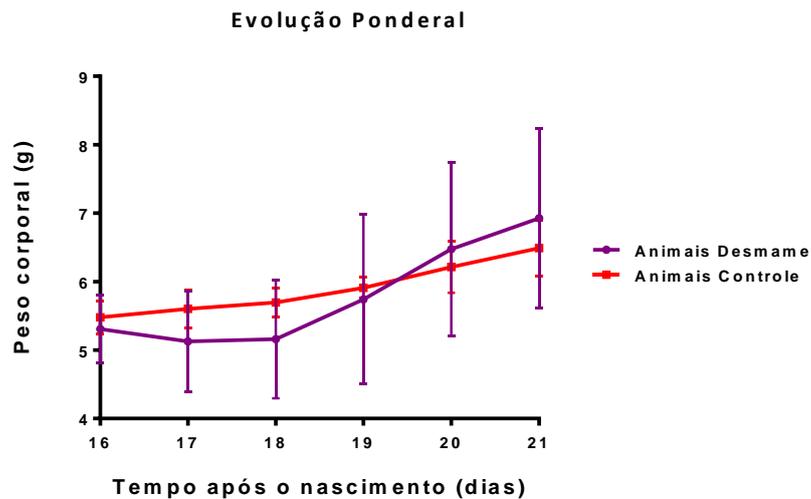


Figura 9: Evolução ponderal dos animais controle e desmame precoce. O peso dos animais controle e desmamados precocemente foi avaliado nas idades de 16 a 21 dias. N = 5 animais por grupo

Em geral observou-se que, após o desmame precoce, o aumento natural de expressão dos genes metabólicos ao longo das idades se acentuou. Ou seja, animais com 3, 4 ou 8 semanas desmamados precocemente apresentaram um maior nível de expressão de um mesmo gene em relação ao 3, 4 e 8 semanas de desenvolvimento normal. Assim, animais de mesma idade, mas com diferentes idades de desmame, apresentam diferentes níveis de expressão dos genes metabólicos hepáticos (**Figuras 10, 11, 12, 13, 14**).

O padrão de expressão gênica do desmame precoce também foi representado por meio de um *heatmap* (**Figura 15**). Observa-se que os animais de 3, 4 e 8 semanas desmamados precocemente apresentam uma maior expressão dos genes metabólicos em relação à essas mesmas idades de animais com desmame normal.

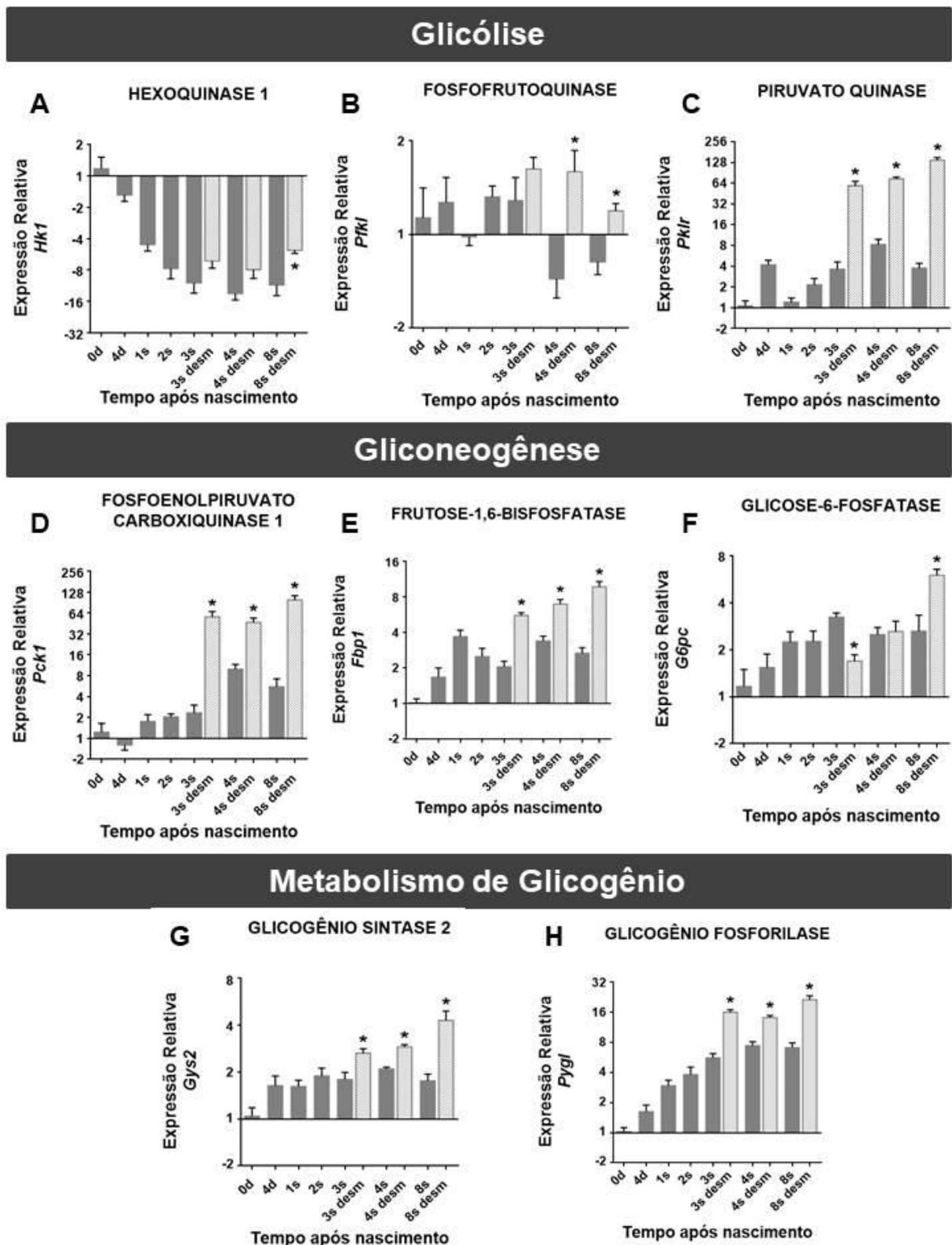


Figura 10: Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos ao longo do desenvolvimento e após desmame precoce. Expressão relativa de genes das vias de glicólise (A, B, C), gliconeogênese (D, E, F) e metabolismo de glicogênio (G, H) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. * indica diferença estatística entre animais de mesma idade com ou sem desmame precoce (teste T; $p < 0,05$).

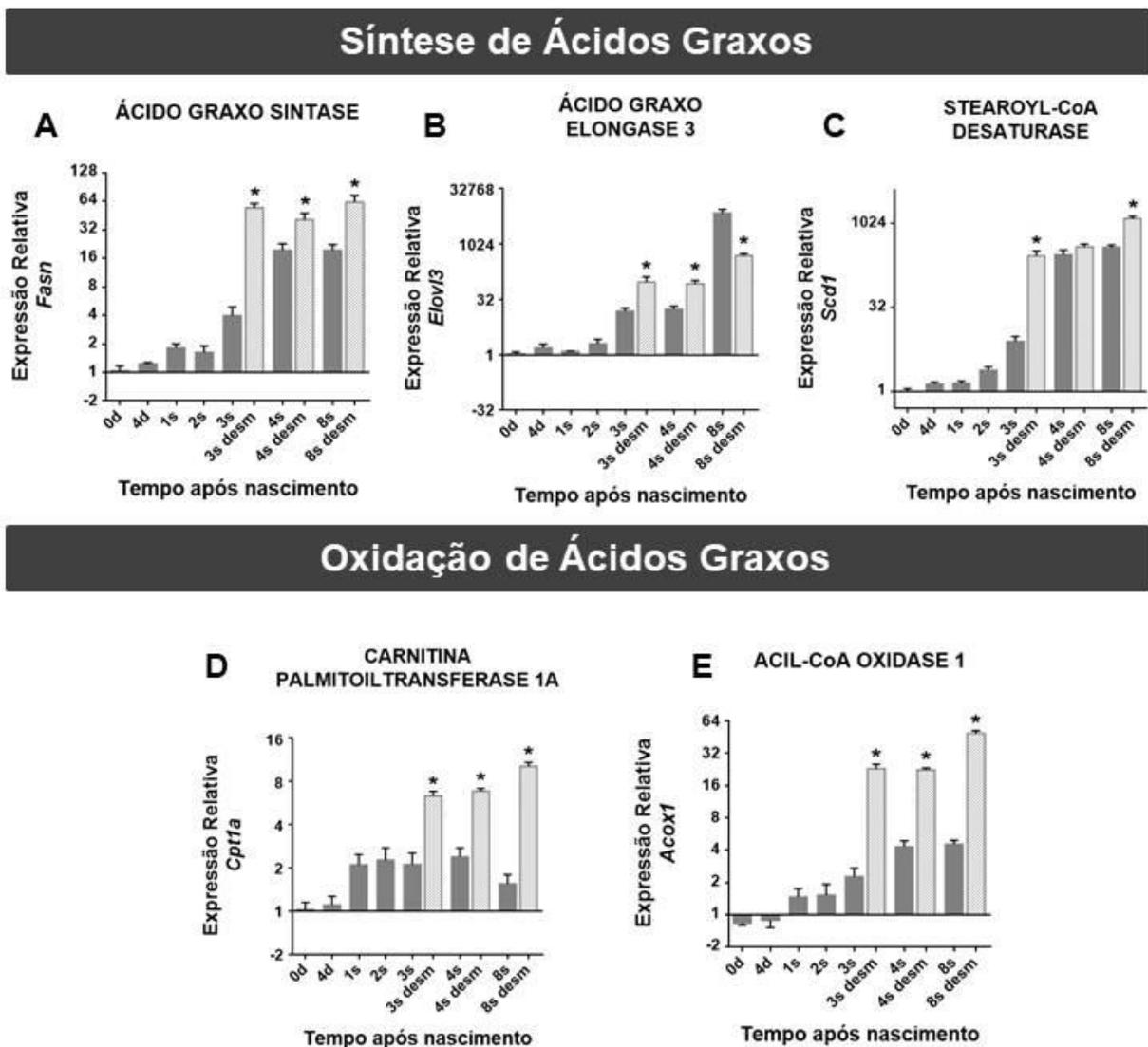


Figura 11: Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos ao longo do desenvolvimento e após desmame precoce. Expressão relativa de genes de síntese de ácidos graxos (A, B, C) e oxidação de ácidos graxos (D, E) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. * indica diferença estatística entre animais de mesma idade com ou sem desmame precoce (teste T; $p < 0,05$).

Proteínas Relacionadas ao Metabolismo de Lipídeos

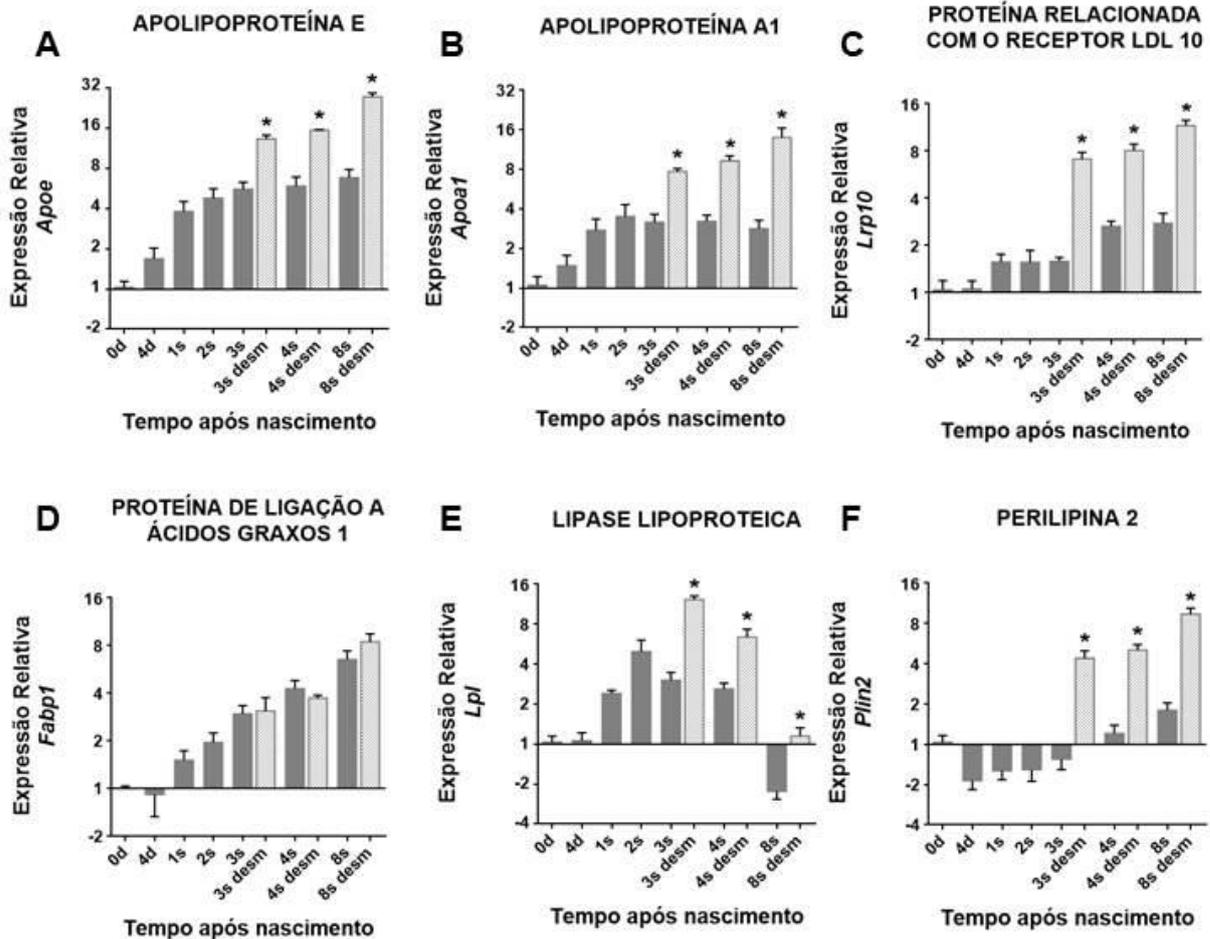


Figura 12: Expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos ao longo do desenvolvimento e após desmame precoce. Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos (A-F) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. * indica diferença estatística entre animais de mesma idade com ou sem desmame precoce (teste T; $p < 0,05$).

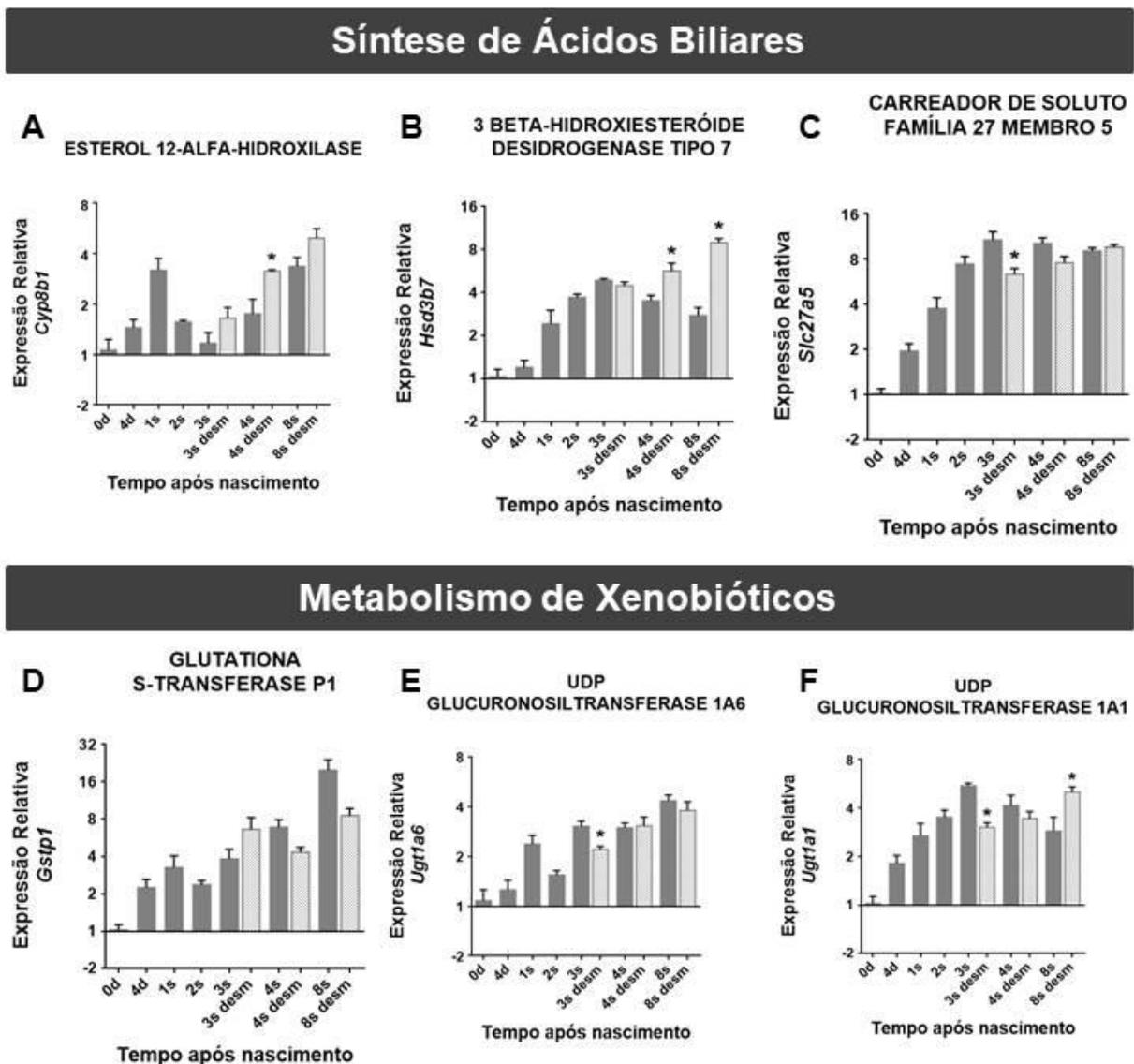
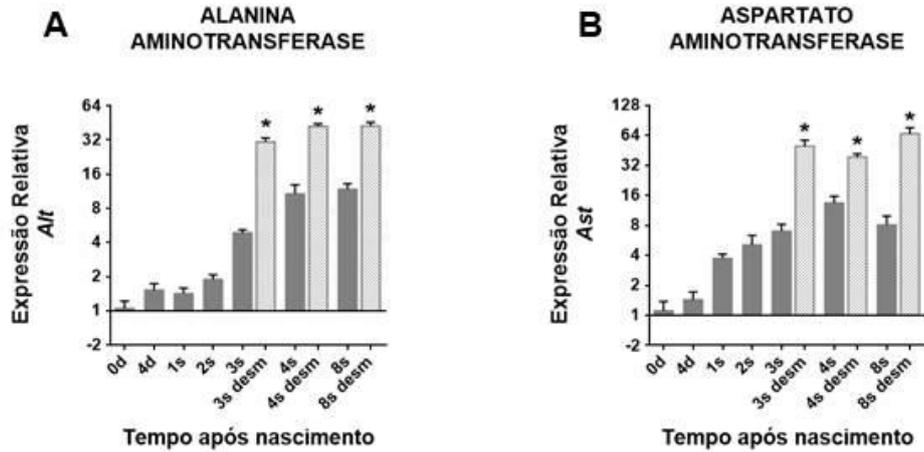


Figura 13: Expressão gênica de enzimas do metabolismo de ácidos biliares e xenobióticos ao longo do desenvolvimento e após desmame precoce. Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo de ácidos biliares (A, B, C) e ao metabolismo de xenobióticos (D, E, F) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. * indica diferença estatística entre animais de mesma idade com ou sem desmame precoce (teste T; $p < 0,05$).

Aminotransferases



Proteínas do Fígado

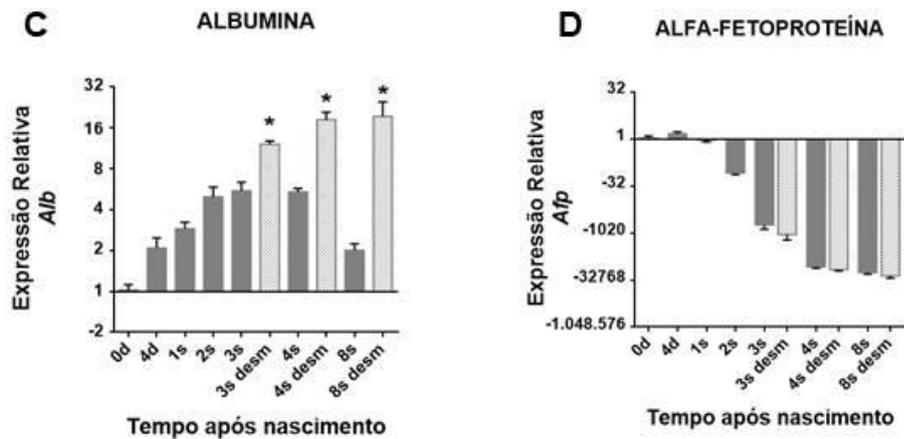


Figura 14: Expressão gênica de aminotransferases e proteínas carreadoras ao longo do desenvolvimento e após desmame precoce. Expressão relativa de aminotransferases (A, B) e proteínas carreadoras produzidas pelo fígado (D, E) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. * indica diferença estatística entre animais de mesma idade com ou sem desmame precoce (teste T; $p < 0,05$).

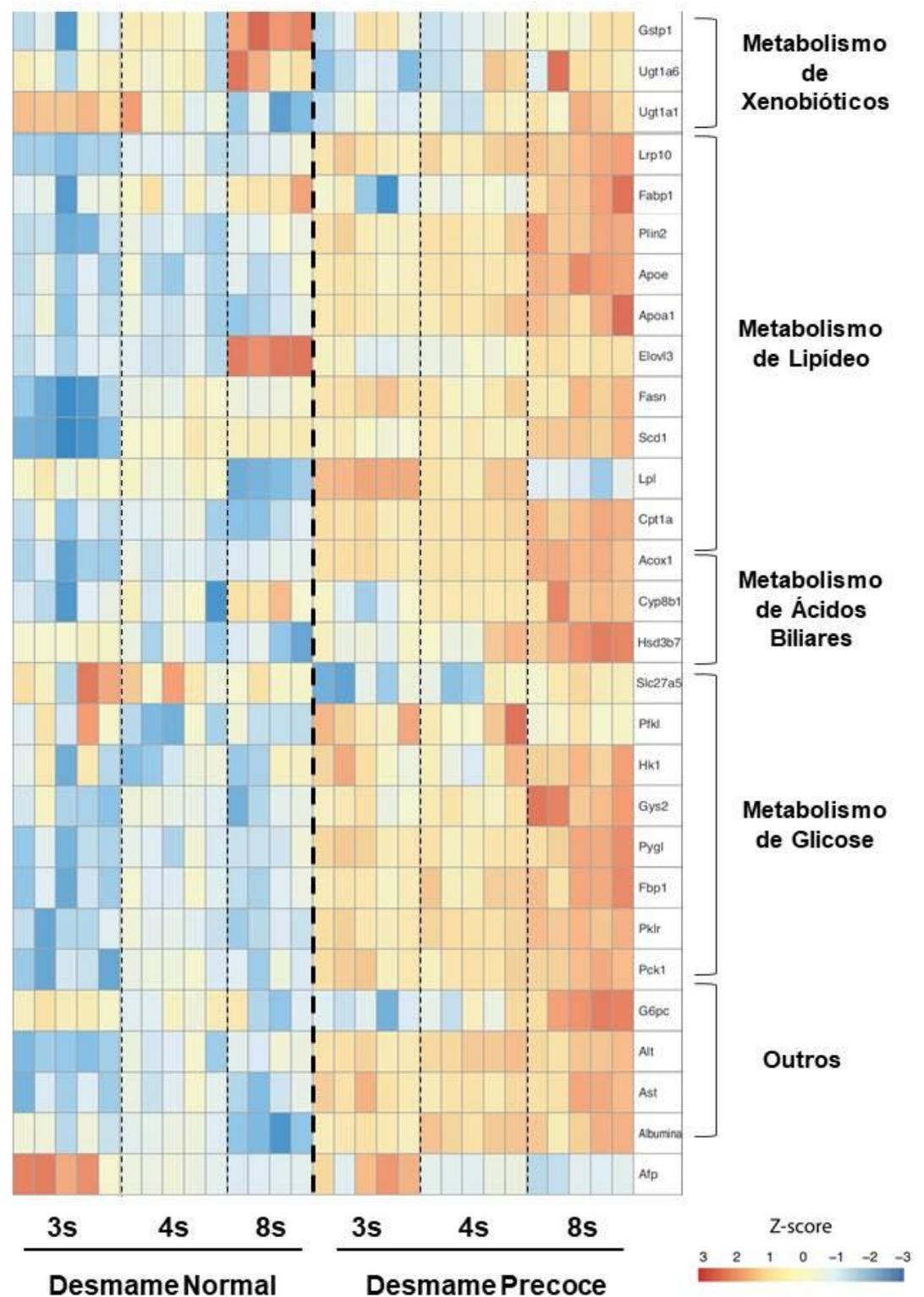


Figura 15: Expressão gênica do metabolismo hepático após desmame precoce. Representação em heatmap de 29 genes pertencentes a vias do metabolismo hepático avaliados por meio de qPCR. Estão representadas as idades de 3s, 4s e 8s durante desenvolvimento normal e após desmame precoce. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 0 dia foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo.

Como animais de mesma idade, que foram desmamados em diferentes momentos, se encontram em diferentes tempos pós desmame, analisamos as idades de 4 semanas (4s) do desenvolvimento normal em relação à 3 semanas (3s) do desmame precoce, pois ambos se encontram no mesmo período após desmame (uma semana após o desmame). Observou-se que, apesar de se encontrarem em um mesmo tempo após o dia do desmame, os animais de 3s do desmame precoce apresentam maior nível de expressão dos genes metabólicos (**Figuras 16, 17, 18, 19, 20**). O evento do desmame precoce, portanto, altera o programa normal do desenvolvimento hepático, elevando a expressão dos genes de metabolismo até a vida adulta, causando impactos diferentes em relação ao desmame normal não podendo ser considerado como apenas um adiantamento do evento de desmame.

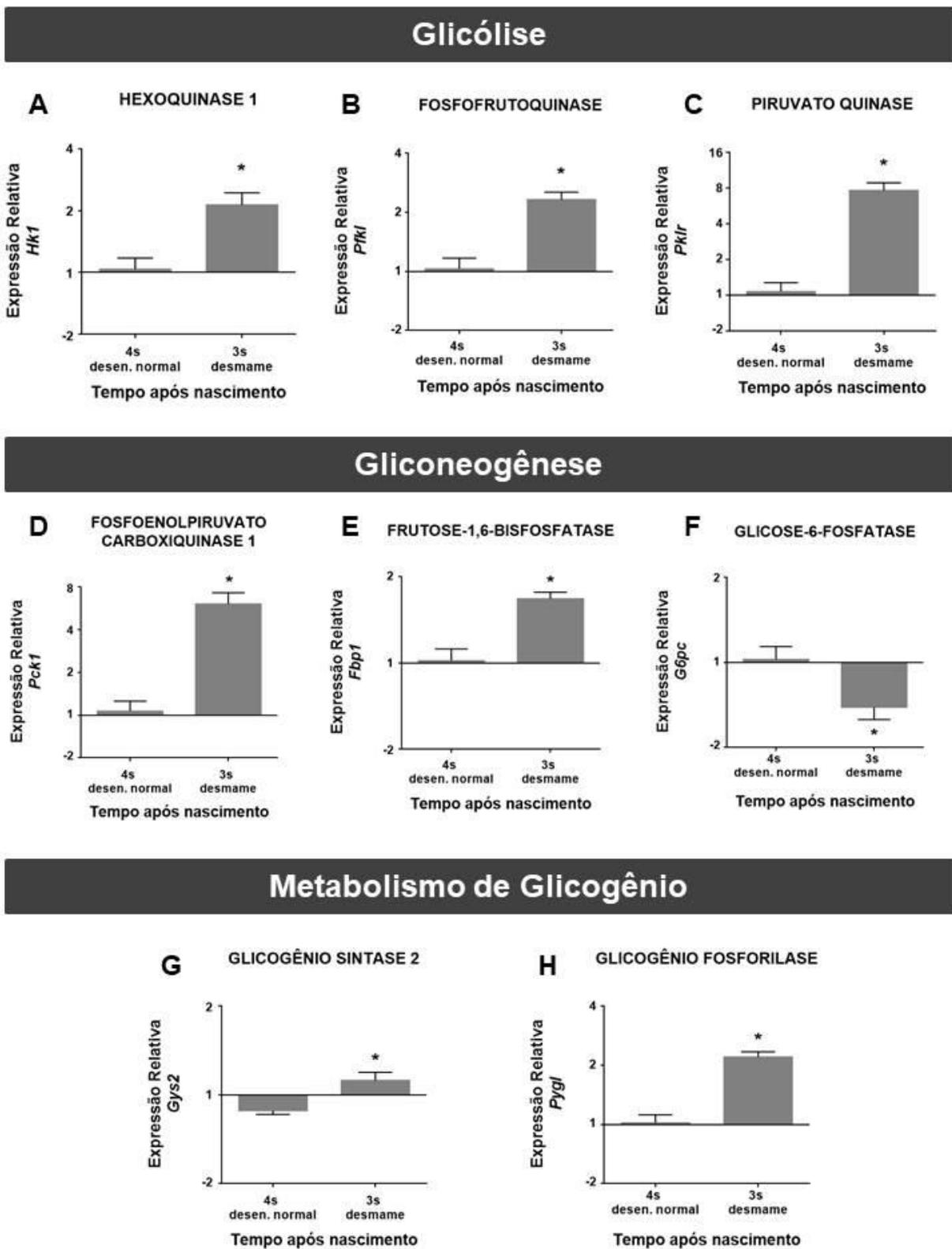


Figura 16: Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos uma semana após desmame. Expressão relativa de genes das vias de glicólise (A, B, C), gliconeogênese (D, E, F) e metabolismo de glicogênio (G, H) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 4 semanas do desenvolvimento normal foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média ± SEM. * indica diferença estatística entre os dois grupos (teste T; $p < 0,05$).

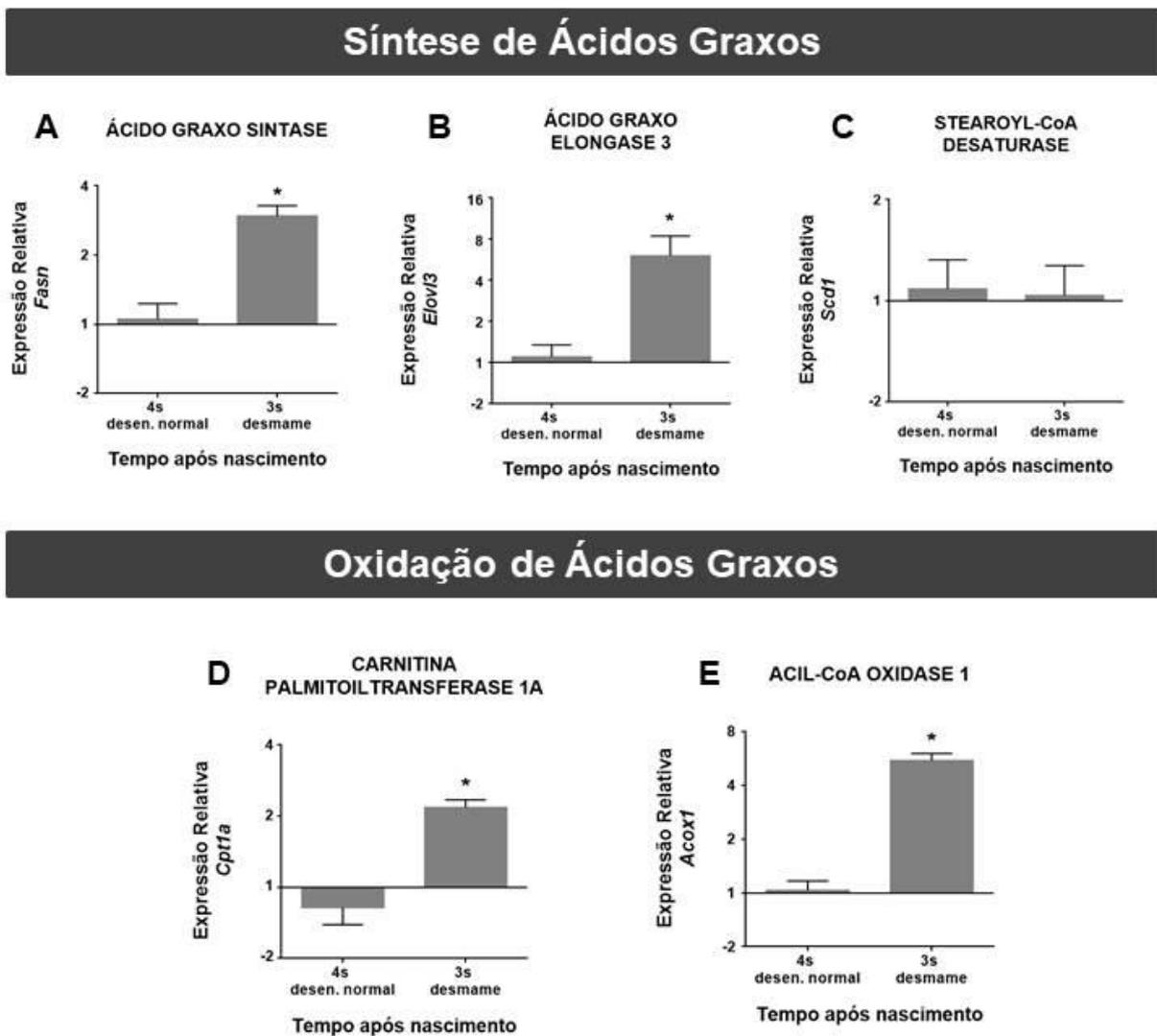


Figura 17: Expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos uma semana após desmame. Expressão relativa de genes de síntese de ácidos graxos (A, B, C) e oxidação de ácidos graxos (D, E) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 4 semanas do desenvolvimento normal foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. * indica diferença estatística entre os dois grupos (teste T; $p < 0,05$).

Proteínas Relacionadas ao Metabolismo de Lipídeos

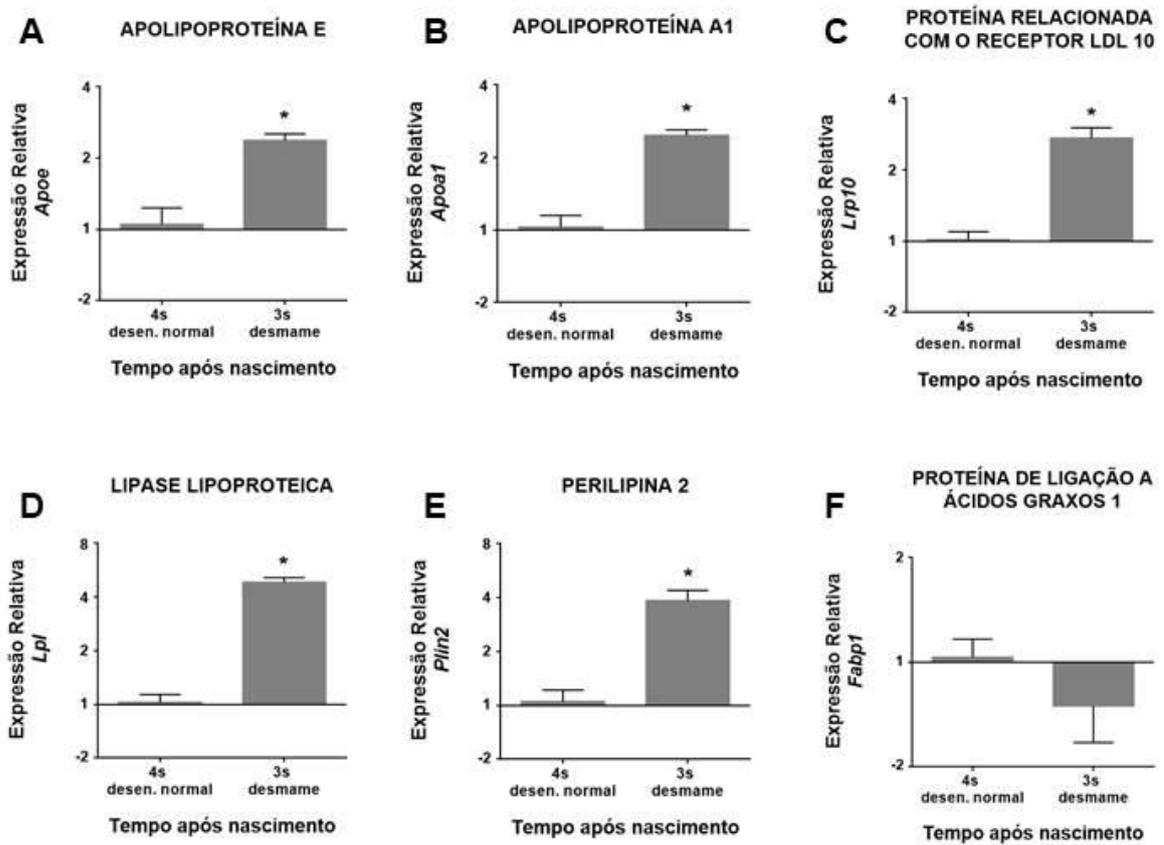


Figura 18: Expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos uma semana após desmame. Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos (A-F) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 4 semanas do desenvolvimento normal foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. * indica diferença estatística entre os dois grupos (teste T; $p < 0,05$).

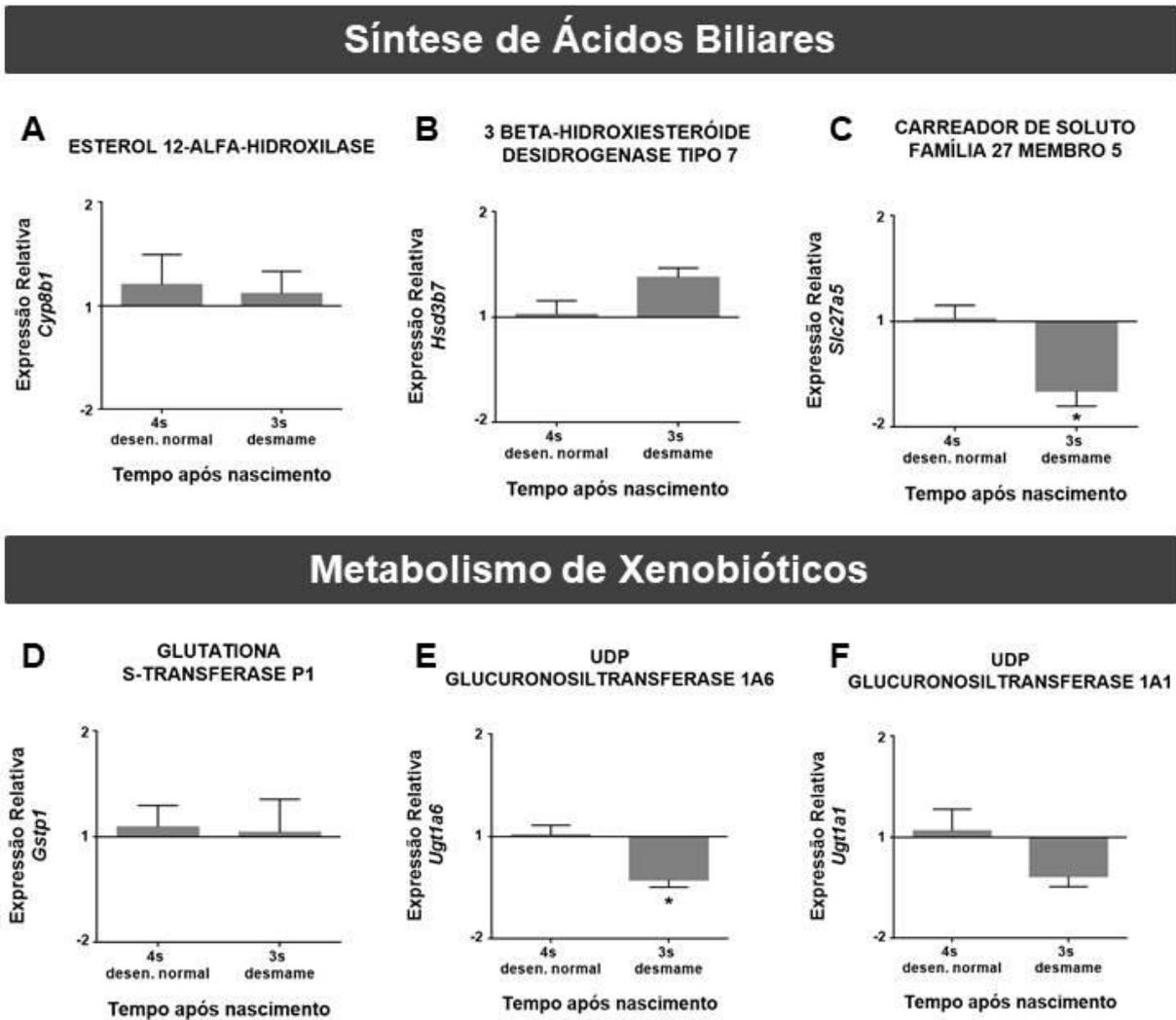
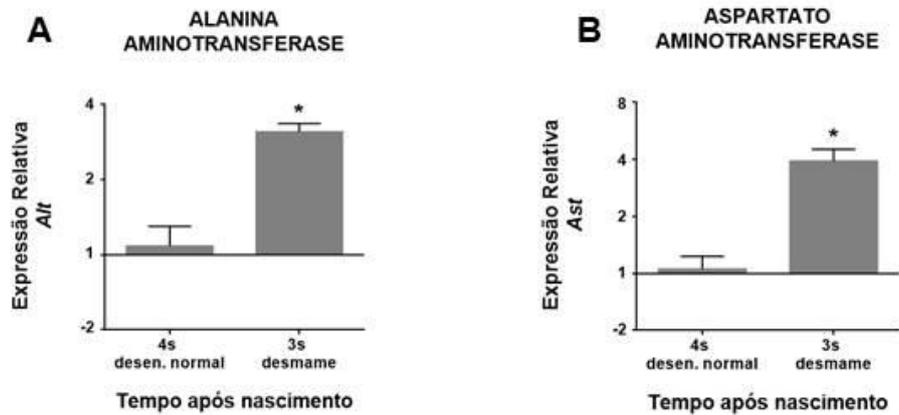


Figura 19: Expressão gênica de enzimas do metabolismo de ácidos biliares e xenobióticos uma semana após desmame. Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo de ácidos biliares (A, B, C) e ao metabolismo de xenobióticos (D, E, F) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 4 semanas do desenvolvimento normal foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. * indica diferença estatística entre os dois grupos (teste T; $p < 0,05$).

Aminotransferases



Proteínas do Fígado

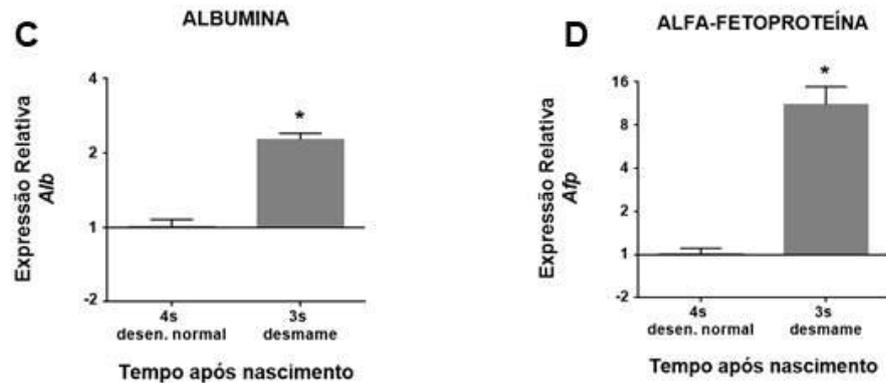


Figura 20: Expressão gênica de aminotransferases e proteínas carreadoras uma semana após desmame. Expressão relativa de aminotransferases (A, B) e proteínas carreadoras produzidas pelo fígado (D, E) avaliados por meio de qPCR. *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno para normalização. A idade de 4 semanas do desenvolvimento normal foi utilizada como controle de expressão. N = 5 animais por grupo. Erro indicado por média \pm SEM. * indica diferença estatística entre os dois grupos (teste T; $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O fígado desempenha importantes funções bem caracterizadas no período fetal, onde apresenta atividade predominantemente hematopoiética. Já no adulto, o fígado se torna um importante órgão metabólico, mantendo ainda uma importante função imune, porém não mais hematopoiética. Entretanto, as adaptações que ocorrem no fígado que permitem sua transição de um órgão fetal hematopoiético para metabólico no adulto ainda não são bem descritas. Esse período de transição neonatal é marcado por grandes mudanças para o indivíduo e o fígado deve se adaptar a essas mudanças, garantindo a sobrevivência mediante as novas condições extrauterinas. De fato, em um curto período, o fígado deve ser capaz de lidar com produtos da microbiota gastrointestinal, antígenos alimentares, moléculas complexas para processamento e compostos xenobióticos. Deve, também, assumir o controle definitivo da homeostase energética corporal juntamente com o tecido adiposo, lidando com períodos de alimentação e jejum, antes não existentes no feto. A disponibilidade de nutrientes para processamento também sofre grandes alterações nesse período com a transição de uma alimentação via cordão umbilical *in utero* para o recebimento de leite materno e, após o desmame, uma alimentação sólida. Neste contexto de mudanças abruptas na dieta e conseqüentemente no metabolismo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a dinâmica das alterações metabólicas do fígado durante o período neonatal até a vida adulta.

Inicialmente, buscamos entender funcionalmente a capacidade metabólica hepática. Tal abordagem, haja visto as múltiplas funções hepáticas, é ousada e complexa. Porém, nosso grupo padronizou em estudos anteriores (DAVID et al., 2016) um modelo que embora limitado, reflete em tempo real a capacidade depurativa hepática, sendo sensível a situações de disfunções hepáticas, como lesão aguda por medicamentos. O estudo se iniciou com a comparação da função hepática entre adultos e diferentes idades de recém-nascidos pela avaliação da capacidade de depuração do corante verde de indocianina. Observamos que, até a segunda semana de vida (2s), o fígado não é competente em depurar o verde de indocianina em comparação a animais adultos, indicando uma menor capacidade funcional hepática. Tal funcionalidade depurativa só é alcançada na 3ª semana de vida, se igualando aos parâmetros observados até a fase adulta. Desta forma, estabelecemos um primeiro pilar para a continuidade do nosso trabalho:

funcionalmente – em termos metabólicos - fígados de recém-nascidos são diferentes de adultos. Para expandirmos nossos achados, buscamos em um segundo momento avaliar uma outra faceta da funcionalidade metabólica hepática: o manejo de lipídeos. Já é bem descrito na literatura que o fígado é de extrema importância da dinâmica de lipídeos, sendo um órgão intermediário de processamento e endereçamento de diversas modalidades de moléculas associadas a ácidos graxos. Portanto, é de se esperar que redução nestas funções metabólicas hepáticas vão impactar diretamente nos estoques de lipídeos no fígado. De fato, um dos primeiros sintomas observados em pacientes com morbidades hepáticas é o acúmulo intracelular de lipídeos – descrito inicialmente como uma degeneração gordurosa ou esteatose – que pode evoluir para quadros mais graves de fibrose e cirrose hepática. Nós hipotetizamos que tal disfuncionalidade transitória observada em recém nascidos poderia também refletir na dinâmica de estocagem lipídica hepática. Nesta segunda etapa, então, padronizamos uma avaliação dos estoques lipídicos do órgão por microscopia confocal. Há acúmulo de lipídeos no fígado até a primeira semana de vida (1s). O estoque de lipídeos hepáticos se reduz, então, a partir da segunda semana (2s) e os animais da terceira semana (3s) já apresentam os níveis de deposição de lipídeos dos indivíduos da idade adulta (8s). Assim como funcionalmente o fígado se torna igual ao adulto na terceira semana (3s), observa-se que os estoques lipídicos do órgão também se igualam ao adulto na mesma idade de 3 semanas. A grande quantidade de lipídeos estocada no órgão neonatal pode, provavelmente, ser explicada por sua alta presença no leite materno. Os lipídeos chegam ao fígado em excesso e são ali acumulados, podendo ser utilizados no período de transição alimentar do desmame.

Sabendo que o fígado neonatal apresenta uma disfunção em relação ao fígado de animais adultos e que esta disfunção reflete na maior deposição de lipídeos do órgão, procuramos realizar uma caracterização metabólica do fígado a nível molecular nas diferentes idades do desenvolvimento neonatal ao adulto, através da análise da expressão de genes envolvidos em vias do metabolismo por PCR em tempo real. Isso nos permitiria avaliar, assim, quais vias do metabolismo, especificamente, se encontram disfuncionais no fígado neonatal.

A composição nutricional da dieta neste período é fundamental para o entendimento do metabolismo no fígado e o padrão de expressão de enzimas

metabólicas encontrado. Após o nascimento, o fornecimento constante de glicose da mãe via cordão umbilical é interrompido. Até o período do desmame, que ocorre com a idade de 3 semanas (3s), os animais possuem como fonte de energia o leite materno, formado por 69% de gordura, 8% de carboidratos e 23% de proteínas (ANGEL; BACK, 1985) sendo, assim, muito rico em lipídeos e pobre em carboidratos. Com o reduzido fornecimento de carboidratos na alimentação, a obtenção de energia pela oxidação da glicose (glicólise), assim como a síntese de glicogênio, diminuem. O fígado deve, portanto, ativar sua produção de glicose através do aumento da gliconeogênese e quebra de estoques hepáticos de glicogênio acumulados durante o período fetal (GRIJALVA; VAKILI, 2013; WARD PLATT; DESHPANDE, 2005).

Na via da glicólise analisada neste trabalho, observou-se uma redução da expressão de Hk1 com o desenvolvimento, com a idade de 3 semanas (3s) atingindo os níveis de expressão vistos no adulto (8s). Entretanto, a expressão de Pfk1 não se altera e a Pklr sofre aumento. Apesar dos dados de Hk1 sugerirem uma ativação maior da glicólise no período inicial neonatal e Pklr sugerirem uma menor ativação, é difícil estabelecer uma conclusão a respeito do funcionamento geral desta via no desenvolvimento. A expressão ainda elevada de Hk1 no período próximo ao nascimento, nas idades de 0 e 4 dias principalmente, pode ser reflexo da grande dependência fetal de glicose como fonte de energia, com alta expressão dos genes de Hk1, Pfk1 e Pklr nesse período (RENAUD et.al., 2014).

Observamos aumento na expressão dos genes que codificam as enzimas de gliconeogênese (Fbp1, G6pc e Pck1) com o desenvolvimento, indicando que esta via pode estar menos ativa no início do período neonatal, principalmente em 0 e 4 dias. Assim, a elevação esperada nessa via não ocorre tão prontamente após o nascimento.

Nos genes da glicólise e gliconeogênese o padrão inicial de expressão encontrado não condiz com a esperada menor atividade de glicólise e maior atividade de gliconeogênese, o que poderia ser explicado por 3 aspectos: 1- o período inicial, até uma semana de vida (1s), parece ser ainda um momento de transição e adaptação do órgão às novas condições, com respostas aos novos estímulos não tão prontamente observadas; 2- esse atraso na resposta pode indicar uma inabilidade metabólica hepática de adaptar-se às novas necessidades,

atrasando a ativação ou inativação da expressão de suas enzimas; 3- apesar de não observarmos um aumento ou redução na transcrição dos genes logo após o nascimento as vias podem estar mais ou menos ativas pela regulação da atividade das enzimas. A gliconeogênese, por exemplo, já pode estar mais ativa no período pós-nascimento por um aumento na atividade das enzimas Pck e G6pc (GRIJALVA; VAKILI, 2013; WARD PLATT; DESHPANDE, 2005).

A expressão das aminotransferases Alt e Ast, responsáveis pela entrada de aminoácidos na via de gliconeogênese para produção de glicose, é menor no neonato, com aumento significativo a partir da terceira semana (3s) até o adulto. A reduzida expressão desses genes pode indicar uma menor entrada de aminoácidos para a síntese de glicose via gliconeogênese e seu desvio para processos ainda essenciais a um órgão em desenvolvimento. É importante destacar que a menor expressão dessas enzimas torna a interpretação de dados clínicos de dosagem de Alt e Ast no soro de neonatos duvidosos, podendo ser encontrados níveis baixos apesar da existência de lesão hepática.

Com relação aos genes do metabolismo de glicogênio, o gene que codifica a enzima Pygl, responsável pela quebra de glicogênio, também apresentou um aumento de expressão tardio, iniciando somente com 4 dias (4d), se tornando significativo apenas na segunda semana (2s). A alta taxa de quebra de glicogênio descrita por outros trabalhos (SHELLEY, 1961) ocorre apenas logo após o nascimento, mas não se mantém durante o período de amamentação, já que os estoques de glicogênio encontram-se reduzidos nesse período. Renaud (2014) demonstra aumento na expressão de Pygl logo antes ao nascimento, com rápida queda na expressão um dia após o nascimento e nova elevação apenas após o dia 10. Assim, a indução dos genes relacionados a glicogenólise ocorre ainda antes do nascimento, não tendo sido, assim, observadas nesse trabalho onde as análises se iniciam após o nascimento.

O gene de síntese de glicogênio, Gys2, por sua vez também tem aumento de expressão a partir de 4 dias (4d) mas estatisticamente significativo apenas a partir de 2 semanas (2s). O resultado obtido condiz com as observações de que o estoque de glicogênio permanece baixo durante a amamentação, no qual a glicose vinda da alimentação é escassa, e aumentam após o desmame (SHELLEY, 1961). Pygl e Gys2 tem aumento significativo, portanto, no mesmo período, com 2 semanas,

próximo ao desmame, período em que pode ter início a formação de estoques de glicogênio por Gys2 e sua quebra para utilização por Pygl.

Com o alto fornecimento de lipídeos na alimentação, há um aumento hepático da oxidação de ácidos graxos e cetogênese. Esse processo é importante para o fornecimento de energia e corpos cetônicos, que constituem importante fonte de energia alternativa à glicose no período neonatal (WARD PLATT; DESHPANDE, 2005). Por outro lado, há uma menor necessidade de produção de lipídeos pelo próprio organismo ocorrendo, assim uma redução na via de síntese (HERRERA, 2000).

As enzimas de síntese de ácidos graxos Fasn, Elovl3 e Scd1 aumentam sua expressão apenas da terceira semana (3s) em diante, ou seja, após o desmame, quando há uma grande redução na ingestão de lipídeos, devido ao seu baixo teor na alimentação sólida. Os dados de expressão gênica confirmam, portanto, a menor síntese de ácidos graxos durante a amamentação. Renaud (2014) também demonstra uma reduzida expressão dessas enzimas no período de amamentação, com aumento após o desmame.

Cpt1a apresentou aumento de expressão a partir da semana 1 (1s) até a semana 4 (4s), com pequena redução na idade adulta (8s), apesar das alterações não serem estatisticamente significativas. A atividade de β -oxidação hepática parece, portanto, estar mais acentuada no período de amamentação, apesar da ativação apenas uma semana após o nascimento. Segundo Ward Platt (2005), os ácidos graxos de cadeia longa são responsáveis pela regulação pós-transcricional de Cpt, promovendo um aumento da β -oxidação, o que justifica o aumento tardio e em pequena proporção em nível de regulação transcricional, já que a regulação dessa via parece ocorrer principalmente pela regulação da atividade da enzima. Observamos, também, um aumento do gene Acox1 a partir da semana 1 (1s), sendo significativo nas semanas 4 (4s) e 8 (8s), podendo indicar que a oxidação de ácidos graxos no peroxissomo se torna mais ativa ao longo do desenvolvimento. Renaud (2014) demonstra uma redução de Cpt1a após o desmame e aumento de Acox1 sugerindo a mudança de oxidação mitocondrial para peroxisossomal.

Genes relacionados ao transporte de lipídeos, pelo plasma ou intracelular, se encontram reduzidos nas idades iniciais do desenvolvimento. Apoe apresenta aumento na expressão a partir de 4d e o receptor Lrp10 tem aumento em 1s

indicando que a captura de lipídeos dos remanescentes de quilomícrons e IDL pelo fígado neonatal se torna mais acentuada a partir da semana 1 (1s). *Apoa1*, presente no HDL, também aumenta em 4d e *Fabp1*, responsável pelo transporte intracelular de ácidos graxos, aumenta sua expressão com 1s. O aumento da expressão desses genes responde ao grande aporte de lipídeos recebidos pelo leite, sendo este período um momento de grande necessidade de transporte de lipídeos pela corrente sanguínea e nos hepatócitos. O aumento na expressão gênica se torna evidente, entretanto, principalmente a partir da semana 1 (1s), indicando que o período pós-nascimento representa ainda uma fase de adaptação à nova condição para ativação da transcrição do gene. Renaud (2014) também demonstra um aumento de proteínas relacionadas a gotículas lipídicas e VLDL, como *Apoa1*, após o nascimento para acomodar o grande influxo de lipídeo do leite. A perilipina, parte da estrutura de gotículas lipídicas, não altera ao longo do desenvolvimento tendo apenas um pequeno aumento na idade adulta (8s). *Lpl* apresenta um perfil de aumento entre as semanas 1 (1s) a 4 (4s) e redução na expressão na idade adulta (8s). Segundo Herrera (2000), a expressão de *Lpl* no fígado do adulto é baixa, mas está presente no período neonatal, tornando o fígado do neonato um órgão de grande captura dos lipídeos provenientes da alimentação e carregados em quilomícrons, que serão utilizados nos processos de oxidação. Após desmame os níveis de *Lpl* caem até os níveis adultos.

Genes relacionados à síntese de ácidos biliares, *Slc27a5*, *Hsd3b7* e *Cyp8b1*, tem menor expressão nas idades iniciais, aumentando sua expressão a partir da semana 1 (1s). Segundo Grijalva (2013) e Diehl-Jones (2002), os neonatos possuem menor capacidade de síntese e secreção de bile, o que pode ser demonstrado pela reduzida expressão das enzimas. Renaud (2014) também demonstra um aumento na expressão de enzimas do metabolismo de ácidos biliares próximo à idade de desmame. O metabolismo de xenobióticos também se encontra reduzido no neonato, como pode ser observado pela menor expressão das enzimas *Gstp1*, *Ugt1a6* e *Ugt1a1*, com aumentos começando na primeira semana (1s). Diehl-Jones (2002) também relata menor captura e eliminação de xenobióticos pelos neonatos devido a um atraso na expressão dessas enzimas. Isso pode refletir em um maior tempo para eliminação dessas substâncias pelo organismo, sendo necessários cuidados nas doses e intervalos de administração de fármacos a neonatos.

O gene que codifica a proteína carreadora plasmática produzida pelo fígado, albumina, apresentou um aumento na expressão com 4 dias (4d), atingindo níveis adultos. Apesar de trabalhos indicarem que sua produção se inicia no período gestacional e apresenta níveis adultos ao nascimento (BEATH, 2003; GRIJALVA; VAKILI, 2013), ainda há um ajuste desses níveis nos primeiros dias de vida. O aumento de sua expressão é importante para acomodar o grande influxo de lipídeos que necessitam ser carreados pelo plasma. A Afp, por sua vez, é a principal proteína plasmática produzida pelo feto e sua produção ainda é presente no início do período neonatal. A expressão de Afp reduz a partir de duas semanas (2s). Como indicado por Li (2009) esse gene reduz sua expressão após o nascimento, praticamente não sendo produzida no adulto. Lee (2012) também demonstra a alta expressão de Afp até o dia 7 pós-nascimento com sucessiva queda. A Afp é o análogo fetal da albumina e sua expressão reduz no período neonatal sendo, entretanto, ainda encontrada na primeira semana após o nascimento indicando que o órgão ainda está em período de adaptação e características fetais ainda se mantêm por certo período.

Os resultados demonstram, em geral, menor expressão de vários genes relacionados ao metabolismo no neonato entre as idades de 0 dia (0d) e uma semana (1s) indicando menor atividade do metabolismo hepático no início da vida pós-natal. Estudos do perfil de expressão de genes hepáticos no desenvolvimento por Microarray e RNA-Seq também demonstram diferentes padrões de expressão nas diferentes idades. A expressão gênica fetal se caracteriza por um predomínio de genes envolvidos na organogênese, desenvolvimento e diferenciação do órgão, com a ativação de genes de controle de ciclo celular, proliferação e sinalização celular (LEE et al., 2012; LI et al., 2009). Também se encontram mais expressos nesse período genes envolvidos na hematopoiese, refletindo a principal função do fígado fetal (JOCHHEIM et al., 2003). No início do período neonatal, até o dia 10 aproximadamente, ainda estão ativos genes envolvidos na organização tecidual como genes de morte celular, movimento celular, organização de citoesqueleto, morfologia celular, proliferação e outros (GUNEWARDENA et al., 2015) e genes de metabolismo ainda menos expressos. A partir do dia 20 até a fase adulta, estão expressos genes do metabolismo de lipídeos, carboidratos, proteínas e fármacos,

indicando a mudança do órgão para a sua adaptação a função majoritariamente metabólica (GUNEWARDENA et al., 2015; JOCHHEIM et al., 2003; LI et al., 2009).

Observamos, então, que o fígado neonatal apresenta menor atividade metabólica principalmente entre o dia 0 (0d) e a primeira semana (1s) do desenvolvimento pós-natal. O padrão de expressão dos genes se eleva ao longo do desenvolvimento e atinge os níveis de expressão semelhante ao adulto (8s) no período próximo ao desmame, nas idades de 3 e 4 semanas (3s e 4s). O evento de desmame parece, assim, ser um ponto importante no processo de mudança do perfil metabólico animal. Procuramos, então, avaliar se o desmame participa da regulação das alterações no perfil de expressão gênica metabólica. Avaliamos, também, a resposta metabólica hepática frente a um desafio nutricional durante o período de desenvolvimento. Para isso, desenvolvemos um protocolo de desmame precoce onde os animais foram desmamados uma semana antes da idade convencional. Os filhotes com duas semanas de idade (2s) foram separados da mãe e sua ingestão de água e comida acompanhada durante a primeira semana de desmame. Apesar de uma perda de peso observada inicialmente, o protocolo de desmame precoce se mostrou eficiente uma vez que os animais voltaram a ganhar peso e se desenvolveram normalmente até a vida adulta.

Os animais desmamados precocemente apresentaram maior expressão dos genes metabólicos nas idades de 3, 4 e 8 semanas quando comparados aos animais de mesma idade, mas desmamados no período normal. Em animais com mesmo tempo pós-desmame, mas desmamados em diferentes idades, a elevação na expressão gênica também foi maior no grupo de desmame precoce. Isso nos indica, portanto, que o desmame precoce não é simplesmente o adiantamento do evento do desmame, mas se configura como um insulto nutricional ao animal. Os efeitos na expressão gênica provocados pelo desmame precoce se estenderam, portanto, até a vida adulta. Essa observação se complementa a estudos de alterações nutricionais no período neonatal e seus efeitos posteriores no indivíduo adulto. As mudanças nutricionais no período neonatal ou na fase de desmame podem ser provocadas pela alteração na quantidade de nutrientes disponíveis - estudos de hipernutrição e má nutrição (FUENTE-MARTÍN et al., 2012; RAMON-KRAUEL et al., 2018) - ou na composição da dieta - fornecendo diferentes tipos e quantidades de lipídeos e carboidratos (DESAI; BABU; ROSS, 2007; ROBERT et al.,

2009). Esses desafios nutricionais promovem alterações no perfil metabólico que persistem até a vida adulta aumentando o risco de desenvolvimento de doenças crônicas como obesidade, resistência a insulina, diabetes e esteatose. Os efeitos a longo prazo podem, entretanto, permanecer silenciados e serem observados apenas após desafio nutricional. Somando a esses estudos, observamos que a idade em que o desmame é feito – no período normal ou precocemente - também resulta em impactos para o desenvolvimento do metabolismo animal. O desmame precoce alterou o programa de desenvolvimento metabólico elevando a expressão dos genes metabólicos até a vida adulta. Essas observações se tornam importantes atualmente, período em que a duração da amamentação vem reduzindo e apenas 35% das crianças são exclusivamente amamentadas por leite materno nos primeiros 4 meses de vida, contrariando a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 6 meses (WHO, 2002).

É importante salientar que os dados apresentados por este trabalho se referem à transcrição gênica pela avaliação do nível de expressão de RNAm na célula. Entretanto, há muitos níveis de regulação da expressão como controles de processamento do RNAm, tradução e atividade da enzima. Assim, enzimas que não tem sua transcrição alterada podem estar mais ou menos ativas pela regulação de sua atividade, por exemplo. A avaliação dos níveis de RNAm por qPCR é, assim, apenas um dos indícios do que pode estar ocorrendo no desenvolvimento metabólico hepático. Sabe-se, também, que após o nascimento há colonização do trato gastrointestinal com microrganismos e essa população se altera ao longo do desenvolvimento neonatal à medida que ocorrem as mudanças na ingestão de nutrientes. A mudança nessa microbiota pode, também, interferir nos processos metabólicos avaliados nesse trabalho e são de interesse para futura investigação.

Nossos dados sugerem, portanto, que o fígado passa por adaptações em seu metabolismo após o nascimento até estabelecer suas funções do órgão adulto. A função metabólica hepática é menor nos primeiros períodos da vida e a expressão dos genes do metabolismo se eleva com o desenvolvimento, adquirindo o perfil do órgão adulto no período próximo ao desmame, na terceira semana de vida. Podemos observar, ainda, que não há um programa de desenvolvimento metabólico e a mudança da idade de desmame, com o adiantamento de uma semana, eleva a expressão dos genes metabólicos até a vida adulta. As alterações nutricionais no

início da vida têm efeitos, portanto, que persistem até o indivíduo adulto. O entendimento da fisiologia e adaptação metabólica do fígado em seu desenvolvimento após o nascimento até a vida adulta serve de base para a tomada de melhores medidas de nutrição neonatal.

7. CONCLUSÕES

O fígado de animais neonatos e adultos são diferentes em termos funcionais e metabólicos. A função hepática encontra-se reduzida no período neonatal como observado pela reduzida capacidade de depuração do corante verde de indocianina e pelo acúmulo de lipídeos no fígado. O animal passa por mudanças metabólicas ao longo da vida, apresentando menor expressão de genes envolvidos no metabolismo no início do período neonatal e aumento nessa expressão ao longo do desenvolvimento. A aquisição do perfil metabólico semelhante ao adulto ocorre próximo ao período do desmame, na semana 3, indicando que este evento parece ser importante para guiar as alterações metabólicas do período. Também é importante destacar que não há um programa fixo de desenvolvimento metabólico uma vez que o animal responde a desafios nutricionais como do desmame precoce alterando a expressão de seus genes metabólicos. O desmame precoce, portanto, causa alterações no padrão de expressão gênica que persistem até a vida adulta podendo impactar no desenvolvimento de doenças como diabetes, obesidade e esteatose hepática sendo, portanto, de suma importância o acompanhamento da nutrição neonatal como forma de reduzir futuros impactos no indivíduo adulto resultantes da adoção de medidas nutricionais inadequadas nas idades iniciais de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

ADEVA-ANDANY, M. M. et al. Liver glucose metabolism in humans. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. e00416–e00416, 2016.

ANGEL, Joseph F.; BACK, Donald W. Weaning and metabolic regulation in the rat. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 538–545, 1985.

BEATH, S. .. Hepatic function and physiology in the newborn. **Seminars in Neonatology**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 337–346, 2003.

CHIANG, John Y. L. Bile Acid Metabolism and Signaling. In: TERJUNG, Ronald (Ed.). **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.

DAVID, Bruna Araujo et al. Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 151, n. 6, p. 1176–1191, 2016.

DE AGUIAR VALLIM, Thomas Q.; TARLING, Elizabeth J.; EDWARDS, Peter A. Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 657–669, 2013.

DESAI, Mina; BABU, Jooby; ROSS, Michael G. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 293, n. 6, p. R2306–R2314, 2007.

DIEHL-JONES, William; FRASER ASKIN, Debbie. The Neonatal Liver, Part 1: Embryology, Anatomy, and Physiology. **Neonatal Network**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 5–12, 2002.

DOSE, Janina et al. APOE genotype and stress response - a mini review. **Lipids in Health and Disease**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-016-0288-2>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

FAYBIK, P.; HETZ, H. Plasma Disappearance Rate of Indocyanine Green in Liver Dysfunction. **Transplantation Proceedings**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 801–802, 2006.

FUENTE-MARTÍN, Esther et al. Early nutritional changes induce sexually dimorphic long-term effects on body weight gain and the response to sucrose intake in adult rats. **Metabolism**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 812–822, 2012.

FURUHASHI, Masato; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 489–503, 2008.

GIBBONS, Geoffrey F.; ISLAM, Khwaja; PEASE, Richard J. Mobilisation of triacylglycerol stores. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1483, n. 1, p. 37–57, 2000.

GORDILLO, M.; EVANS, T.; GOUON-EVANS, V. Orchestrating liver development. **Development**, [s. l.], v. 142, n. 12, p. 2094–2108, 2015.

GRIJALVA, James; VAKILI, Khashayar. Neonatal liver physiology. **Seminars in Pediatric Surgery**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 185–189, 2013.

GRUPPUSO, Philip A.; SANDERS, Jennifer A. Regulation of liver development: implications for liver biology across the lifespan. **Journal of Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. R115–R125, 2016.

GUILLOU, Hervé et al. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. **Progress in Lipid Research**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 186–199, 2010.

GUNewardena, Sumedha S. et al. Deciphering the Developmental Dynamics of the Mouse Liver Transcriptome. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. e0141220, 2015.

HAN, Hye-Sook et al. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. **Experimental & Molecular Medicine**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. e218, 2016.

HERRERA, Emilio; AMUSQUIVAR, Encarnacio. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. **Diabetes Metab Res Rev**, [s. l.], p. 9, 2000.

JENNE, Craig N.; KUBES, Paul. Immune surveillance by the liver. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 996–1006, 2013.

JIN, Weijun; MARCHADIER, Dawn; RADER, Daniel J. Lipases and HDL metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 174–178, 2002.

JOCHHEIM, Andrea et al. Multi-stage analysis of differential gene expression in BALB/C mouse liver development by high-density microarrays. **Differentiation**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 62–72, 2003.

JONES, John G. Hepatic glucose and lipid metabolism. **Diabetologia**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 1098–1103, 2016.

KIHARA, A. Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. **Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 152, n. 5, p. 387–395, 2012.

KIM, Jung-whan; DANG, Chi V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 142–150, 2005.

KIM, W. Ray et al. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. **Hepatology**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 1363–1370, 2008.

LEE, Janice S. et al. Transcriptional ontogeny of the developing liver. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 33, 2012.

LI, Tingting et al. Multi-stage analysis of gene expression and transcription regulation in C57/B6 mouse liver development. **Genomics**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 235–242, 2009.

- LITWACK, Gerald. Glycolysis and Gluconeogenesis. In: **Human Biochemistry**. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 183–198.
- MANNERS, David J. Recent developments in our understanding of glycogen structure. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 37–82, 1991.
- MCGILL, Mitchell R.; JAESCHKE, Hartmut. Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 2174–2187, 2013.
- MIHALIK, Stephanie J. et al. Participation of Two Members of the Very Long-chain Acyl-CoA Synthetase Family in Bile Acid Synthesis and Recycling. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 27, p. 24771–24779, 2002.
- MIZEJEWSKI, Gerald J. Biological Roles of Alpha-Fetoprotein During Pregnancy and Perinatal Development. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 229, n. 6, p. 439–463, 2004.
- MOSCOVITZ, Jamie; ALEKSUNES, Lauren. Establishment of Metabolism and Transport Pathways in the Rodent and Human Fetal Liver. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 23801–23827, 2013.
- NAKAGAKI, Brenda Naemi et al. Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 1294–1307, 2018.
- NGUYEN, P. et al. Liver lipid metabolism. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 272–283, 2008.
- OKUMURA, Toshikatsu. Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. **Journal of Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 629–636, 2011.
- ONAL, Gizem et al. Lipid Droplets in Health and Disease. **Lipids in Health and Disease**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0521-7>>. Acesso em: 9 dez. 2018.
- RAMON-KRAUEL, Marta et al. Epigenetic programming at the *Mogat1* locus may link neonatal overnutrition with long-term hepatic steatosis and insulin resistance. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 6025–6037, 2018.
- ROBERT, Clotilde Des et al. Metabolic effects of different protein intakes after short term undernutrition in artificially reared infant rats. **Early Human Development**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 41–49, 2009.
- ROTHSCHILD, Marcus A.; ORATZ, Murray; SCHREIBER, Sidney S. Serum albumin. **Hepatology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 385–401, 1988.
- RUI, Liangyou. Energy Metabolism in the Liver. In: TERJUNG, Ronald (Ed.). **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 177–197.

SANDERS, Francis W. B.; GRIFFIN, Julian L. *De novo* lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose: Hepatic *de novo* lipogenesis and metabolic disease. **Biological Reviews**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 452–468, 2016.

SCHIEVING, J. H. et al. Alpha-fetoprotein, a fascinating protein and biomarker in neurology. **European Journal of Paediatric Neurology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 243–248, 2014.

THIELE, Christoph; SPANDL, Johanna. Cell biology of lipid droplets. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 378–385, 2008.

VOLLMAR, Brigitte; MENGER, Michael D. The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 1269–1339, 2009.

WANDERS, Ronald J. A. et al. The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 479–494, 2010.

WANG, GuQi et al. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 56, n. 12, p. 2238–2247, 2015.

WARD PLATT, Martin; DESHPANDE, Sanjeev. Metabolic adaptation at birth. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 341–350, 2005.

YANAGIDA, Ayaka et al. Liver maturation deficiency in p57Kip2^{-/-} mice occurs in a hepatocytic p57Kip2 expression-independent manner. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 407, n. 2, p. 331–343, 2015.