



# CONTROLE DA NEOGLICOGENESE HEPÁTICA POR RECEPTORES COLINÉRGICOS

**Palavras-Chave:** receptor  $\alpha 7$ , gliconeogênese, fígado

## **Autores:**

Gabriella Claudiano Inês (FCA/UNICAMP); Suleyma de Oliveira Costa (FCA/UNICAMP); Wenicios Ferreira Chaves (FCA/UNICAMP); Priscilla Karla Fernandes Lopes (FCA/UNICAMP); Prof. Dra. Adriana Souza Torsoni (FCA/UNICAMP); Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni (FCA/UNICAMP)

## **1. Introdução**

Diabetes Mellitus do tipo II é uma doença metabólica complexa de causas multifatoriais. Em pacientes diabéticos o aumento da gliconeogênese é responsável pelo aumento da produção hepática de glicose e hiperglicemia de jejum (Kimura *et al.*, 2012; Lartigue, de *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2002). A expressão das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) são importantes para a regulação da gliconeogênese (Radziuk e Pye, 2001). Os hormônios insulina e glucagon e a citocina IL-6 participam do controle da expressão destas enzimas (Radziuk e Pye, 2001).

O fator de transcrição STAT3 é fosforilado e ativo por ligantes como a citocina IL-6, leptina e receptores colinérgicos (Buettner *et al.*, 2006; Chang, Chavan e Pavlov, 2019; Matthews *et al.*, 2010). Inoue e colaboradores mostraram que a sinalização de STAT3 tem papel importante na regulação de genes da gliconeogênese hepática e consequentemente na manutenção da homeostase glicêmica (Inoue *et al.*, 2004). O mesmo grupo demonstrou que a ação da insulina no sistema nervoso central (SNC) contribui para a ativação hepática de STAT3, sendo assim responsável pela regulação da produção hepática de glicose por dois mecanismos distintos. Um deles mediado pela ativação da proteína PI3 quinase, e o outro pela ativação de STAT3 pela citocina IL-6 que regula a expressão dos genes PCK1 e G6Pc (Inoue *et al.*, 2006).

Kimura e colaboradores (2012) demonstraram, ainda, que a indução de estresse de retículo em camundongos diabéticos inibe expressão de STAT3 hepática e consequentemente melhora a deficiência das enzimas gliconeogênicas, o que desempenha papel importante no aumento da produção de glicose hepática em camundongos obesos e diabéticos (Kimura *et al.*, 2012). Os autores demonstraram ainda em outro estudo que o controle da gliconeogênese pelo fator de transcrição STAT3 pode ser dependente da inervação vagal no fígado que culmina na ativação do receptor colinérgico nicotínico subunidade  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ nAChR) na células de Kupffer (Kimura *et al.*, 2016).

O receptor  $\alpha 7$ nAChR tem sido associado ao controle da resposta inflamatória, um mecanismo mediado pelo nervo vago que faz a comunicação entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune (Blalock, 2002; Tracey, 2002). Esta via é denominada "reflexo anti-inflamatório colinérgico". Dois tipos de receptores colinérgicos participam deste braço do reflexo anti-inflamatório: receptores colinérgicos muscarínicos m1 (m1AChR) no hipotálamo e receptores colinérgicos nicotínicos  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ nAChR) nos tecidos periféricos tais como fígado, tecido adiposo, baço, trato gastrointestinal (TGI) e coração (Tracey, 2009). A ativação desses receptores colinérgicos pela acetilcolina traduz sinais intracelulares que inibem a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Bernik *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010).

A literatura tem mostrado que indivíduos obesos apresentam diminuição da expressão do receptor  $\alpha 7$  (Canello *et al.*, 2012). Assim, como sugerido por alguns autores a diminuição da sinalização do nervo vago em indivíduos obesos pode levar a um aumento da inflamação, resistência à insulina e complicações metabólicas (Carnethon *et al.*, 2003; Ziegler *et al.*, 2006). Recentemente estudos do nosso grupo mostraram que proles de mães obesas desenvolvem resistência à insulina hepática na vida adulta (Fante, De *et al.*, 2016) e que agonistas colinérgicos são capaz de reverter a resistência à insulina em linhagem de hepatócitos (Costa *et al.*, 2020). Outros estudos mostraram ainda que camundongos que são knockout para o receptor  $\alpha 7$ nAChR

quando consomem dieta hiperlipídica desenvolvem resistência hepática à insulina e possuem menor tolerância à glicose (Costa *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018).

Em resultados prévios do grupo observamos que o estímulo central do receptor muscarínico aumenta a fosforilação da proteína STAT3 hepática na prole de mães obesas se comparado à prole de mães controle. Esse aumento da expressão de STAT3 nessas proles pode ser explicado pelo aumento da expressão hipotalâmica do receptor muscarínico do tipo m1. Conseqüentemente a expressão hepática dos genes PCK1 e G6Pc está significativamente diminuído nas proles de mães obesas após o estímulo central do receptor muscarínico (dados não publicados).

Outra modificação da proteína STAT3, como a acetilação, pode estar relacionada a processos fisiológicos através da modulação da fosforilação de STAT3 (Yuan *et al.*, 2005). Nie e colaboradores (2009) mostraram que o jejum de 24h diminuiu a expressão de STAT3 acetilada no fígado de animais c57 e tem sua expressão aumentada no período pós prandial. A fosforilação da proteína STAT3 também foi regulada negativamente pelo jejum dos animais, levando os autores a concluir que o status metabólico do organismo é capaz de alterar a função da proteína STAT3 hepática.

Na condição de jejum a proteína SIRT1 é responsável por ativar a gliconeogênese hepática e assim regular a acetilação ou fosforilação da proteína STAT3 (Rodgers *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008). Nie e colaboradores (2009) mostraram que a proteína SIRT1 aumenta a gliconeogênese hepática mediada pelo aumento da expressão de PGC1 $\alpha$  e FOXO1 fosforilada em resposta ao status nutricional. A proteína SIRT1 pode ainda regular negativamente a função de STAT3 inibir a gliconeogênese hepática (Nie *et al.*, 2009).

Diante disso nossa hipótese de trabalho é que receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos participam da modulação da expressão das enzimas da gliconeogênese hepática, de maneira dependente ou não da ativação da proteína STAT3.

## 2. Métodos

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* machos da linhagem C57BL/6J cedidos da colônia CEMIB-UNICAMP, com aproximadamente 7 semanas de idade. Estes foram divididos em três grupos: controle salina, PNU (agonista do receptor  $\alpha$ 7nAChR) e McN-A-343 (agonista do receptor muscarínico do tipo M1). Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de uma cânula no ventrículo lateral.

O teste de tolerância ao piruvato (PTT) foi realizado após 12h de jejum. Foi realizada injeção de uma solução de piruvato a 20% (2 g/Kg de peso corporal), administrada intraperitonealmente, com posteriores coletas de amostras sanguíneas nos tempos 15, 30, 60, 120 minutos, para as dosagens de glicose. Os animais foram estimulados com PNU (agonista do receptor nicotínico do tipo  $\alpha$ 7) intracerebroventricular (ICV) 40 minutos antes do teste ou com McN-A-343 (agonista do receptor muscarínico do tipo M1) ICV 2 horas antes do teste.

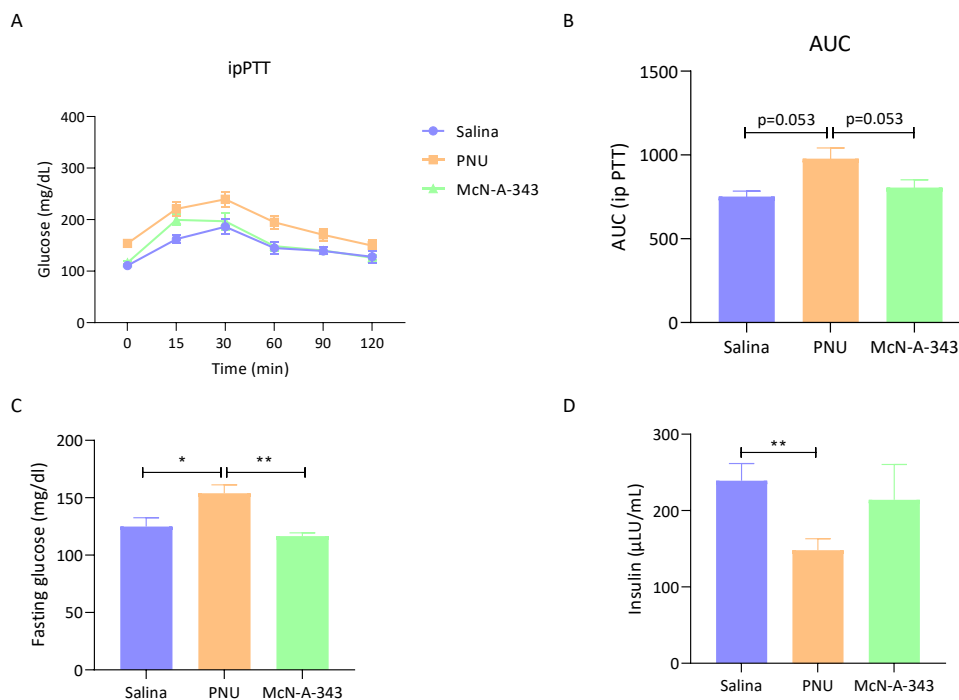
Os estímulos com os agonistas ICV foi repetido após dois dias do teste de PTT para eutanásia dos animais, coleta dos tecidos e posterior análises moleculares por western blotting e real time q-PCR.

Os resultados serão apresentados em média e erro padrão da média. Para a comparação de médias entre dois grupos, foi aplicado o teste t de Student para amostras independentes. Caso necessário, foi utilizada análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni para comparação múltipla de médias ( $p < 0,05$ ). Os dados foram analisados utilizando Prism, versão 8.0.

## 3. Resultados

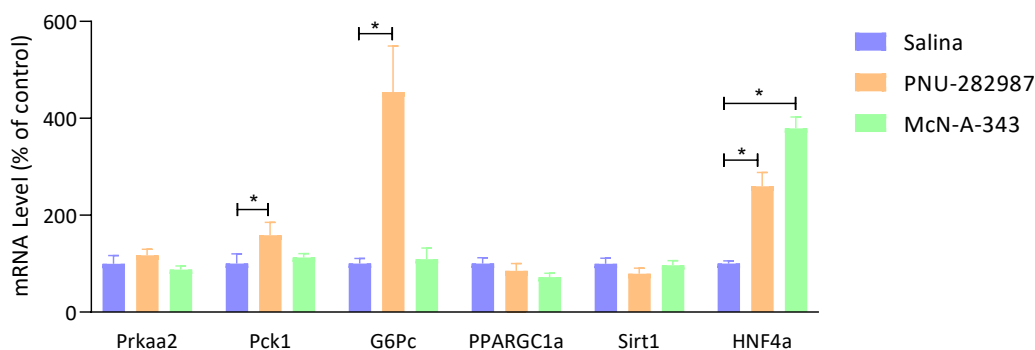
O estímulo intracerebroventricular (ICV) com agonista do receptor  $\alpha$ 7nAChR de forma aguda aumentou a glicemia dos animais após injeção com solução de piruvato (Figura 1A). Sendo que a área sob a curva foi significativamente maior no grupo que recebeu PNU comparado com o grupo que recebeu salina (Figura 1B). Os animais que foram estimulados com McN-A-343, agonista do receptor m1mAChR, não alteraram a glicemia no teste de PTT (Figura 1B). A glicemia de jejum dos animais foi maior no grupo que recebeu PNU comparado com o controle e novamente o grupo que recebeu McN-A-343 não alterou a glicemia (Figura 1C). A insulina foi mensurada no soro dos

animais por KIT após os estímulos com os agonistas. O grupo que recebeu PNU diminuiu significativamente a insulina sérica comparado ao grupo controle (Figura 1D). Estes dados demonstram, então, que a gliconeogênese pode estar aumentada nos animais que recebeu o estímulo agudo com PNU icv.



**Figura 1. Teste de tolerância ao piruvato.** A. Curva glicêmica após estímulo piruvato ip 2 g/Kg de peso corporal; B. Área sob a curva da glicemia do gráfico A. C. Glicemia de jejum; D. Insulina sérica dos animais c57 após estímulo ICV de salina, PNU e McN-A-343 de 40 minutos e 2 horas, respectivamente. Anova entre os grupos, \* $p < 0.05$

Para confirmação do perfil anteriormente observado, foi avaliado a expressão das proteínas da via da gliconeogênese no fígado dos animais estimulados com os agonistas ICV. E foi observado então que o grupo de animais que receberam PNU icv apresentou maiores níveis de mRNA de Pck1, G6Pc e HNF4 $\alpha$  (Figura 2). Esses resultados mostram que a gliconeogênese nos animais que foram estimulados com PNU, agonista de  $\alpha 7nAChR$ , está aumentada. Isto pode ser explicado pelo aumento de HFN4 $\alpha$  que é um alvo da proteína SIRT1. Então, esta parece estar com atividade aumentada nos animais que receberam PNU.

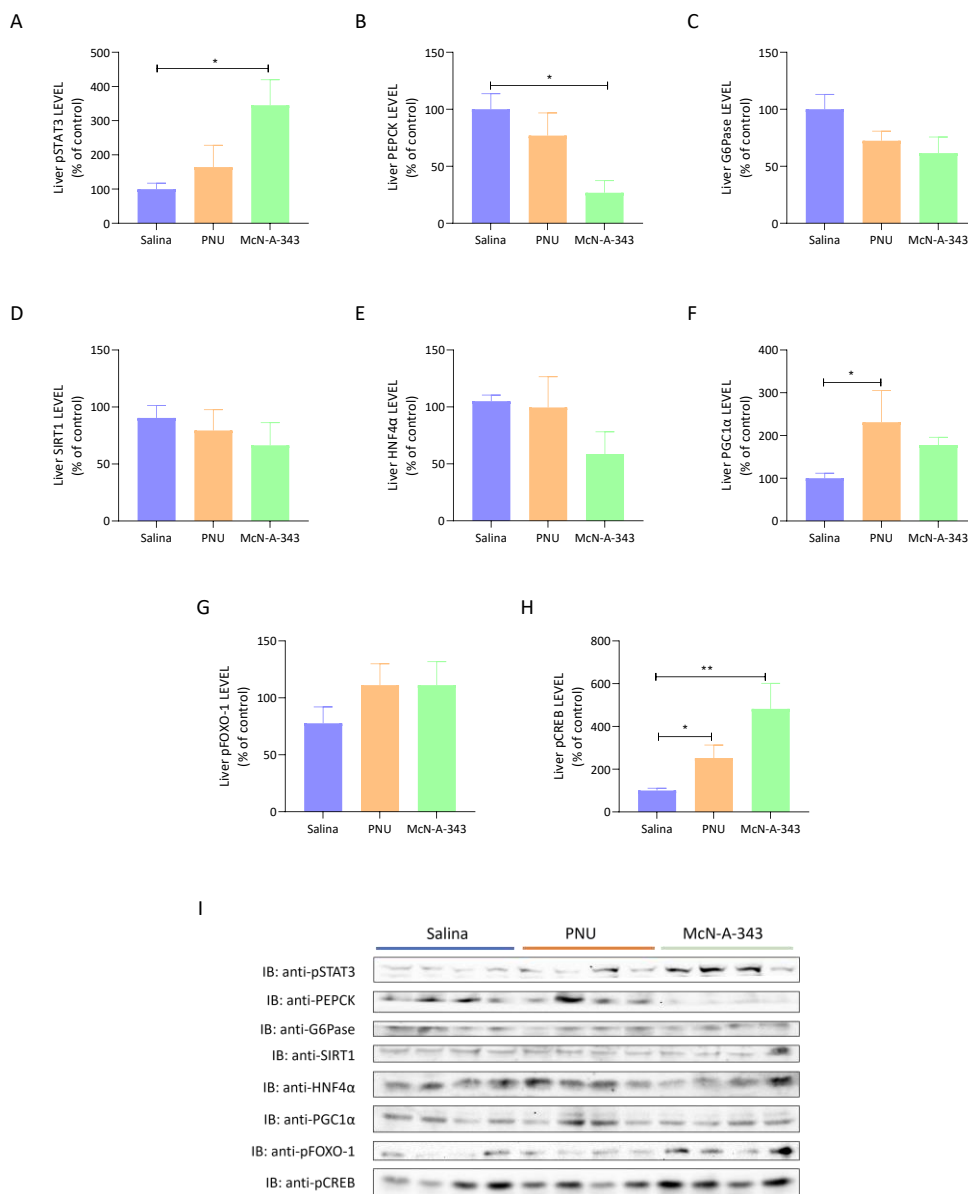


**Figura 2.** Níveis de mRNA hepático de Prkaa2; Pck1; G6Pc; PPARGC1 $\alpha$ ; SIRT1; HNF4 $\alpha$  de animais c57 após estímulo ICV de PNU e McN-A-343 de 40 minutos e 2 horas, respectivamente. A quantidade de mRNA foi normalizada pela quantidade de GAPDH. Anova entre os grupos, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ .

Posteriormente foi avaliado por Western Blotting o conteúdo proteico das proteínas downstream SIRT1 e das enzimas gliconeogênicas no fígado dos animais. Os animais estimulados com PNU ICV aumentou o conteúdo proteico de PGC1 $\alpha$  (Figura 3F), alvo da proteína SIRT1 e apresentou tendencia de aumento de pFOXO-1 (Figura 3G), outro alvo da proteína SIRT1. Os animais estimulados com agonista de  $\alpha$ 7nAChR não apresentaram aumento de fosforilação de STAT3, apenas no grupo que recebeu McN-A-343, agonista de m1mAChR (Figura 3A). Estes resultados sugerem, então, que o estímulo agudo com PNU pode aumentar a atividade de SIRT1 mediado pelo aumento do conteúdo proteico de proteínas downstream na via de sinalização. Esse aumento da atividade de SIRT1, conseqüentemente, inibe a fosforilação da proteína STAT3 e assim ativa a gliconeogênese hepática.

#### 4. Conclusão

Portanto podemos concluir até o momento que o estímulo do receptor  $\alpha$ 7nAChR por agonista colinérgico ICV é capaz de aumentar a gliconeogênese hepática através da regulação positiva da atividade da proteína SIRT1 hepática. Porém mais resultados são necessários para investigar de que forma o receptor colinérgico  $\alpha$ 7nAChR pode regular a atividade da proteína SIRT1 e conseqüentemente alterar vias metabólicas como da gliconeogênese hepática.



**Figura 3.** Quantificação do conteúdo proteico hepático de pSTAT3, A; PEPCCK, B; G6Pase, C; SIRT1, D; HNF4 $\alpha$ , E; PGC1 $\alpha$ , F; pFOXO-1, G; pCREB, H; e imunoblotting representativo das proteínas avaliadas, I; de animais c57 após estímulo ICV de PNU e McN-A-343 de 40 minutos e 2 horas, respectivamente. A quantidade de proteína foi normalizada pela quantidade de GAPDH. Anova entre os grupos, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ .

## Referências

- BERNIK, T. R. *et al.* Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 6, p. 781–788, 2002.
- BLALOCK, J. E. Harnessing a Neural-immune Circuit to Control Inflammation and Shock: Figure 1. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 6, p. F25–F28, 2002.
- BUETTNER, C. *et al.* Critical role of STAT3 in leptin 's metabolic actions. **Cell Metabolism**, v. 4, n. July, p. 49–60, 2006.
- CANCELLO, R. *et al.* The nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  in subcutaneous mature adipocytes: downregulation in human obesity and modulation by diet-induced weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 12, p. 1552–1557, 2012.
- CARNETHON, M. R. *et al.* Influence of Autonomic Nervous System Dysfunction on the Development of Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 11, p. 3035–3041, 2003.
- CHANG, E. H.; CHAVAN, S. S.; PAVLOV, V. A. Cholinergic control of inflammation, metabolic dysfunction, and cognitive impairment in obesity-associated disorders: Mechanisms and novel therapeutic opportunities. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. APR, p. 1–13, 2019.
- COSTA, S. O. *et al.* Maternal high fat diet consumption reduces liver alpha7 nicotinic cholinergic receptor expression and impairs insulin signalling in the offspring. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.
- FANTE, T. DE *et al.* Diet-induced maternal obesity alters insulin signalling in male mice offspring rechallenged with a high-fat diet in adulthood. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–22, 2016.
- INOUE, H. *et al.* Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. **Nature Medicine**, v. 10, n. 2, p. 168–174, 2004.
- \_\_\_\_\_. Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 267–275, 2006.
- KIMURA, K. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Inhibits STAT3-Dependent Suppression of Hepatic Gluconeogenesis via Dephosphorylation and Deacetylation. **Diabetes**, v. 61, n. 1, p. 61–73, jan. 2012.
- \_\_\_\_\_. Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. **Cell Reports**, v. 14, n. 10, p. 2362–2374, 2016.
- LARTIGUE, G. DE *et al.* Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 1, p. E187–E195, 2011.
- LEE, S. T. *et al.* Cholinergic anti-inflammatory pathway in intracerebral hemorrhage. **Brain Research**, v. 1309, p. 164–171, 2010.
- LI, D. J. *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit improves energy homeostasis and inhibits inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 79, p. 52–63, 2018.
- MATTHEWS, V. B. *et al.* Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. **Diabetologia**, v. 53, n. 11, p. 2431–2441, 2010.
- NIE, Y. *et al.* STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1. v. 11, n. 4, 2009.
- RADZIUK, J.; PYE, S. Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 17, n. 4, p. 250–272, 21 jul. 2001.
- SUN, Y. *et al.* Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 26, p. 23301–7, 28 jun. 2002.
- TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–859, dez. 2002.
- TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 418–428, 2009.