



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas



LETÍCIA CELOTTI

**A PARTICIPAÇÃO DA SINALIZAÇÃO COLINÉRGICA, MEDIADA POR
AMPK, SOBRE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS
KNOCKOUT PARA O RECEPTOR $\alpha 7$ nAChR ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERLIPÍDICA.**

Limeira/SP

2021

Letícia Celotti

**A PARTICIPAÇÃO DA SINALIZAÇÃO COLINÉRGICA, MEDIADA POR
AMPK, SOBRE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS
KNOCKOUT PARA O RECEPTOR $\alpha 7nAChR$ ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERLIPÍDICA.**

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Aplicadas da
Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para
a obtenção do título de Mestra em
Ciências da Nutrição e do Esporte e
Metabolismo, na Área de Ciências
Nutricionais e Metabolismo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Souza Torsoni

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO LETÍCIA
CELOTTI, E ORIENTADA PELA PROF^a.
DR^a ADRIANA SOUZA TORSONI.

Limeira/SP

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

C331p Celotti, Leticia, 1997-
A participação da sinalização colinérgica, mediada por AMPK, sobre a regeneração hepática em camundongos *Knockout* para o receptor $\alpha 7$ nAChR alimentados com dieta hiperlipídica / Leticia Celotti. – Limeira, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Adriana Souza Torsoni.
Coorientador: Marcio Alberto Torsoni.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Hepatectomia. 2. Hepatopatia gordurosa não alcoólica. 3. Inflamação. 4. Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$. 5. Dieta hiperlipídica. I. Torsoni, Adriana Souza, 1973-. II. Torsoni, Marcio Alberto, 1967-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The participation of AMPK mediated cholinergic signaling on liver regeneration in knockout mice for the $\alpha 7$ nAChR receiver fed on hyperlipidic diet **Palavras-chave em inglês:**

Hepatectomy

Non-alcoholic fatty liver disease

Inflammation

Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor

Diet, high-fat

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Adriana Souza Torsoni [Orientador]

Marcio Alberto Torsoni

Laís Angélica de Paula Simino

Andressa Reginato

Data de defesa: 14-12-2021

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5043-0565>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3770292711598218>

Folha de Aprovação

Autora: Leticia Celotti

Título: A PARTICIPAÇÃO DA SINALIZAÇÃO COLINÉRGICA, MEDIADA POR AMPK, SOBRE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS KNOCKOUT PARA O RECEPTOR $\alpha 7$ nAChR ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA.

Natureza: Dissertação

Área de Concentração: Metabolismo e Biologia Molecular.

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 12 de dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Adriana Souza Torsoni
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dra. Laís Angélica de Paula Simino
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dra. Andressa Reginato
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Com imensa gratidão, dedico este trabalho a Deus e a Nossa Senhora da Assunção. Também à minha querida família e á meu noivo, que tanto admiro, não há exemplo maior de dedicação do que o da nossa família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus e Nossa Senhora da Assunção por estarem sempre ao meu lado, me abençoando, iluminando e guiando meus passos.

Agradeço aos meus pais, meu irmão e meu noivo, que sempre me motivaram e incentivaram a seguir em frente, a nunca desistir e por estarem comigo em todos os momentos de ansiedade, medos e alegrias. Eles são meu conforto, minha base. Sem eles nada disso seria possível.

Minha eterna Gratidão a Professora Adriana Souza Torsoni, minha orientadora, pelo apoio, inspiração e ensinamentos. Mulher, mãe, pesquisadora e professora excepcional. Obrigada por acreditar e confiar no meu potencial, a cada dia evoluo mais com os seus ensinamentos!

Agradeço a minha dupla, Franciely Alves, cuja colaboração e parceria foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Gratidão a todos os alunos e professores do laboratório de distúrbios do Metabolismo. Com certeza, esse laboratório forma uma grande equipe e se constitui num local rico em aprendizado e conhecimento, o que contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional.

Obrigada a todos os funcionários da FCA, que estavam todos os dias cumprindo seus afazeres com muita alegria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001";

Enfim, minha eterna gratidão a todos que fizeram parte dessa jornada, o caminho foi longo, nem sempre fácil, mas muito gratificante.

Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua produção ou a sua construção. Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo, educo e me educo. Pesquiso para saber o que não conheço e comunicar ou anunciar a novidade (FREIRE, 1996, p. 25).

RESUMO

O consumo exagerado de alimentos hipercalóricos e hiperlipídicos eleva o risco de desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). O espectro deste distúrbio compreende desde uma esteatose simples a esteato-hepatite, cirrose e carcinoma hepatocelular. Em casos mais graves, a única possibilidade é a ressecção de parte do tecido hepático comprometido, através da hepatectomia parcial (PHx), sendo que a sobrevivência do indivíduo depende da capacidade de regeneração hepática (RH), através de um processo inflamatório controlado. A proteína quinase ativada por AMP (AMPK), considerada uma reguladora central da homeostase energética, responde também pelo metabolismo lipídico no fígado, desempenhando papel fundamental no controle da deposição de gordura no fígado e desenvolvimento de DHGNA, consequentemente, auxiliando no processo de RH. Nesse sentido, os receptores colinérgicos nicotínicos do tipo alfa7 ($\alpha 7$ nAChR), através de sua conexão com o nervo vago, vem sendo apontados como moléculas-chaves na supressão da resposta inflamatória, via mecanismo conhecido como via anti-inflamatória colinérgica. Pesquisadores sugerem que a presença e ativação da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) é capaz de reduzir a esteatose hepática, induzida por HFD, por conduzir a ativação da AMPK, que por sua vez suprime a lipogênese. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar o papel do receptor alpha 7 nicotínico e sua relação com a proteína quinase ativada por AMP na regeneração hepática de camundongos knockout para $\alpha 7$ nAChR alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à hepatectomia parcial (2/3 PHx) tratados ou não com metformina. No 51^o. dia de vida, os animais foram submetidos à PHx e avaliados (antes e após 7 dias da cirurgia) quanto à função hepática, capacidade regenerativa e sobrevida. Nossos resultados mostram que o $\alpha 7$ nAChR parece controlar a regeneração hepática, uma vez que sua ausência melhorou a capacidade regenerativa do tecido, mesmo na presença de estímulo inflamatório. Animais KO para $\alpha 7$ nAChR apresentam melhor função mitocondrial e maior expressão de IL10, apesar de maior TG hepático antes da cirurgia e perdem menos peso, apresentam menor lesão hepatocelular e melhor sobrevida após PHx. Ainda, o tratamento com metformina parece ser importante coadjuvante no processo regenerativo, desde que em animais $\alpha 7$ nAChR^{-/-} obesos, tratados com agonista de AMPK, a sobrevivência foi maior após PHx, concomitante com menor TG hepático, maior expressão de IL10 e maior sinalização das vias STAT3 e mTOR que podem contribuir para proliferação celular.

Palavras-chave: Hepatectomia parcial, DHGNA, Inflamação, $\alpha 7$ nAChR, dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

Excessive consumption of hypercaloric and hyperlipidic foods increases the risk of developing non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The spectrum of this disorder ranges from simple steatosis to steatohepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In more severe cases, the only possibility is the resection of part of the compromised liver tissue, through partial hepatectomy (PHx), and the individual's survival depends on the capacity of liver regeneration (HR), through a controlled inflammatory process. The AMP-activated protein kinase (AMPK), considered a central regulator of energy homeostasis, is also responsible for the lipid metabolism in the liver, playing a fundamental role in the control of fat deposition in the liver and the development of NAFLD, consequently, helping in the HR process. In this sense, $\alpha 7$ -type nicotinic cholinergic receptors ($\alpha 7$ nAChR), through their connection with the vagus nerve, have been identified as key molecules in the suppression of the inflammatory response, via a mechanism known as the cholinergic anti-inflammatory pathway. Researchers suggest that the presence and activation of the $\alpha 7$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) is able to reduce hepatic steatosis, induced by HFD, by leading to the activation of AMPK, which in turn suppresses lipogenesis. Thus, the present study sought to evaluate the role of the $\alpha 7$ nicotinic receptor and its relationship with AMP-activated protein kinase in the liver regeneration of $\alpha 7$ nAChR knockout mice fed a high-fat diet submitted to partial hepatectomy (2/3 PHx) treated or not. with metformin. On the 51st. day of life, the animals were submitted to PHx and evaluated (before and after 7 days of surgery) regarding liver function, regenerative capacity and survival. Our results show that $\alpha 7$ nAChR seems to control liver regeneration, since its absence improved tissue regenerative capacity, even in the presence of an inflammatory stimulus. KO animals for $\alpha 7$ nAChR show better mitochondrial function and higher IL10 expression, despite higher hepatic TG before surgery and lose less weight, have less hepatocellular damage and better survival after PHx, since in $\alpha 7$ nAChR^{-/-} obese animals treated with an AMPK agonist, survival was higher after PHx, concomitant with lower hepatic TG, higher IL10 expression and higher signaling of the STAT3 and mTOR pathways that may contribute to cell proliferation.

Keywords: Partial hepatectomy, NAFLD, Inflammation, $\alpha 7$ nAChR, high fat diet.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TGF- α : Fator Transformador do Crescimento-Alfa

ACC: Acetil-CoA carboxilase

ACh: Acetilcolina

AIN-93: Instituto Americano de Nutrição, dieta 93 para roedores

Akt2: Serina/treonina quinase 2

ALT: Alanina amino transferase

AMPK: Proteína quinase ativada por AMP

AST: Aspartato amino transferase

ATP: Adenosina trifosfato

C3a: Proteína do sistema complemento C3a

C5a: Proteína do sistema complemento C5a

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório.

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CHC: Carcinoma hepatocelular

DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico

EHNA: Esteatohepatite não alcoólica

ERK: Quinase regulada por sinais extracelulares

FAS: Ácido Graxo Sintase

FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos

Gp: Glicoproteína

HFD: High-Fat Diet (Dieta rica em gordura)

HGF: Fator de Crescimento do Hepatócito

HMG CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-6R: Receptor de interleucina 6

IMC: Índice de Massa Corporal

ipPTT: Teste de Tolerância intraperitoneal ao Piruvato

JAK: Janus kinase

KO: *Knockout*

MAPK: Proteínas quinases ativadas por mitogênio

mTOR: Alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC1: Complexo mTOR 1

mTORC2: Complexo mTOR 2

MUP: Alfa 2-U-Globulina

NFkB: Fator nuclear *kappa* B

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: Tampão Fosfato-Salina

PBST: Tampão Fosfato-Salina com Triton

PHx: Hepatectomia parcial

PI3K: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase

qRT-PCR: Transcrição Reversa - Reação em cadeia da polymerase quantitativa
Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time

RH: Regeneração hepática

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida

SRBP1c: Proteína ligante ao elemento regulador de esteróis-1

STAT3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TAB: Tecido Adiposo Branco

TGF-β: Fator de Crescimento Transformador beta

TLR4: Receptor do tipo Toll- 4

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa

VIGITEL: Sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

WHO: World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

WT: Wild Type (Selvagem)

α7nAChR: Subunidade α 7 do receptor nicotínico de acetilcolina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado da inflamação do TAB na obesidade e os desfechos decorrentes (adaptado de LEITE <i>et al</i> , 2009)	13
Figura 2 – Evolução da doença hepática gordurosa não alcóolica (DHGNA) adaptado de TRAUNER <i>et al</i> . 2010	15
Figura 3 – Processo de Regeneração Hepática (autoria própria)	17
Figura 4 - Inervação autonômica hepática (TAN, <i>et al</i> , 2020)	18
Figura 5 - Demonstração da via anti-inflamatória colinérgica, Autoria própria.	20
Figura 6 – Ativação da AMPK e seus efeitos no organismo. Autoria Própria...	21
Figura 7 – Ações farmacológicas da metformina na célula hepática, adaptado de RENA <i>et al</i> , 2013	23
Figura 8 - Protocolos experimentais utilizados no estudo. Imagem de autoria própria	27
Figura 9: Desenhos esquemáticos da anatomia do fígado de camundongos e posicionamento dos nós para remoção dos lóbulos. Adaptado de Mitchell e Willenbring, 2008	29
Figura 10: Perfil murinométrico dos grupos experimentais	34
Figura 11: Adiposidade e índice hepatométrico	35
Figura 12: Porcentagem de animais machos que sobreviveram 7 dias após o procedimento de PHx	36
Figura 13: Avaliação da função hepática pelo teste de tolerância ao piruvato.	37
Figura 14: Determinação de lesão hepatocelular por testes bioquímicos	38
Figura 15: Perfil murinométrico dos grupos experimentais	39
Figura 16: Porcentagem de animais machos que sobreviveram 7 dias após o procedimento de PHx	40
Figura 17: Avaliação da função hepática pelo teste de tolerância ao piruvato	41
Figura 18: Análise do consumo de oxigênio e função mitocondrial em camundongos machos	42
Figura 19: Avaliação da expressão gênica de Il6, Il10, Il1b e mTOR antes e após PHx	43
Figura 20: Avaliação da expressão gênica de $\alpha 7nAChR$, antes e 7 dias após PHx	44
Figura 21: Quantificação do conteúdo proteico de p-AMPK, AMPK, p-STAT3, STAT3, pJAK2, JAK2 antes da realização da PHx	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição nutricional das dietas ricas em gordura empregadas no protocolo experimental.....28

Tabela 2: Composição da dieta padrão empregada no protocolo experimental, segundo embalagem.....28

SUMÁRIO

1.1	Obesidade: Definição, Etiologia, Epidemiologia e Comorbidades	15
1.2	Obesidade e Inflamação	16
1.3	Obesidade e Doenças do fígado	16
1.4	Hepatectomia e Regeneração hepática	18
1.5	Obesidade e Regeneração hepática	19
1.6	Sinalização Colinérgica e Receptor $\alpha 7nAChR$	20
1.7	Sinalização colinérgica e AMPK	22
1.	OBJETIVOS	27
2.1	Gerais	27
2.2	Específicos	27
3.1	Aspectos éticos	28
3.2	Modelos animais empregados nos protocolos experimentais	28
3.3	Dietas	29
3.4	Indução de regeneração hepática por hepatectomia parcial (PHx)	30
3.5	Anestesia	32
3.6	Respirometria de alta resolução (Oroboros)	32
3.7	Determinação sérica de Alanina Amino Transferase (ALT) e Aspartato Amino Transferase (AST)	33
3.8	Avaliação da função hepática pela determinação do teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato (ipPTT) e determinação de albumina e bilirrubina	33
3.9	Determinação hepática de triacilgliceróis (TG)	33
3.10	Real-time PCR quantitativo (qRT-PCR)	33
3.11	Western Blotting	34
3.12	Análise estatística	35
4.	RESULTADOS	36
4.1	Efeitos da dieta rica em gordura saturada (hiperlipídica) e da hepatectomia sobre variáveis morformétricas	36
4.2	Efeitos do tratamento com metformina sobre a função hepática	43
4.3	Efeitos da dieta rica em gordura saturada (hiperlipídica), do tratamento com metformina e da hepatectomia parcial sobre a expressão gênica	48
5.	DISCUSSÃO	52
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade: Definição, Etiologia, Epidemiologia e Comorbidades

A obesidade é definida como uma desordem multifatorial ocasionada pelo aumento de gordura corporal decorrente de um quadro de desequilíbrio energético (CINTRA *et al.*, 2020). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2020) mostram que essa enfermidade triplicou entre 1975 e 2016, acometendo cerca de 13 % da população mundial. Estudos prospectivos indicam que, em 2025, aproximadamente 2,3 bilhões de seres humanos estarão com excesso de peso e, destes, mais de 700 milhões serão obesos (WHO, 2020). No Brasil essas estimativas contam com o apoio de um sistema nacional de monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito (VIGITEL), que mostra que nos últimos treze anos houve um aumento da prevalência da obesidade (BRASIL, 2019).

O aumento crescente no número de casos de obesidade em diferentes populações, incluindo países desenvolvidos e subdesenvolvidos, evidencia um dos principais fatores que estão associados à esta epidemia: a influência do ambiente no indivíduo, que compreende as mudanças de comportamento alimentar e os hábitos de vida sedentários (VEDANA *et al.*, 2008). É certo que a etiologia dessa doença possui múltiplas causas e diversas interações entre fatores genéticos, psicológicos, socioeconômicos, culturais e ambientais (JEBB, 1997). Alguns indivíduos apresentam susceptibilidade à obesidade resultante de polimorfismos em genes como o MC4R desenvolvendo uma resposta alterada frente às dietas ricas em gordura (YU *et al.*, 2020). No entanto, defeitos monogênicos contribuem com menos de 5 % de todos os casos de obesidade severa (RANADIVE & VAISSE 2008).

A associação desses fatores gera um ambiente favorável ao aumento de tecido adiposo branco (TAB) e acúmulo de triglicérides (TAN & VIDAL, 2008). O aumento exagerado de TAB é responsável pelo desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade, decorrentes de alterações metabólicas. Dentre elas, destaca-se a resistência à insulina, hipertensão e dislipidemias, todas estas condições características da síndrome metabólica (SM) (LEITE, ROCHA & NETO, 2009).

1.2 Obesidade e Inflamação

Pela primeira vez, em 2003, o pesquisador Hotamisligil comprovou que o tecido adiposo branco de animais obesos era caracterizado pela infiltração de macrófagos, os quais são importantes fontes de inflamação neste tecido. Além disso, a literatura evidencia que o aumento de peso e o consumo excessivo de alimentos com alto teor de gordura e açúcar causa hipertrofia dos adipócitos, comprimindo os vasos sanguíneos no TAB, aumentando o estresse oxidativo e impedindo que haja aporte de oxigênio adequado nos tecidos. Esse quadro leva à ativação de receptores de membrana, culminando na amplificação da resposta inflamatória, estimulando a quimiotaxia de macrófagos e a indução da expressão de genes pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) (TRAYHURN & WOOD, 2004). Ambas são citocinas pró-inflamatórias, também produzidas no fígado, e que estão associadas às condições de obesidade e resistência à insulina. O TNF- α suprime a expressão de genes envolvidos na captação de glicose e no metabolismo e oxidação dos ácidos graxos, já a IL-6 suprime a expressão de adiponectina, de receptores e proteínas que traduzem o sinal da insulina no tecido adiposo, como ilustrado de maneira resumida na Figura 1 (RUAN e LODISH, 2003; MEMOLI *et al.*, 2007).

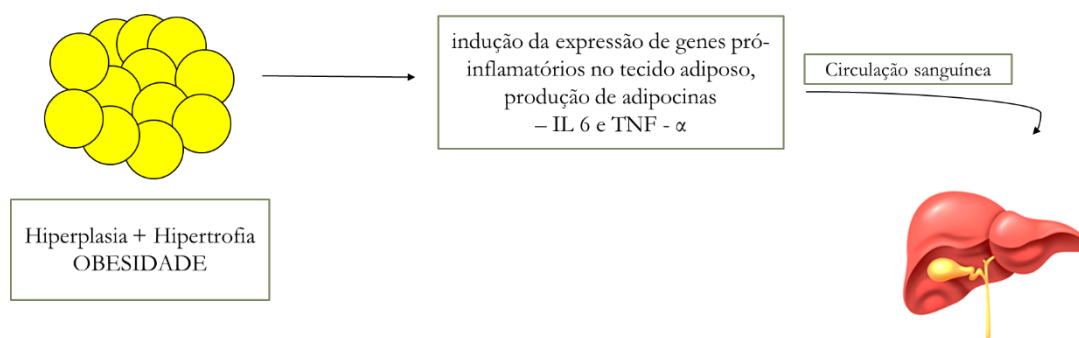


Figura 1 - Esquema simplificado da inflamação do TAB na obesidade e os desfechos decorrentes (adaptado de LEITE *et al.*, 2009).

1.3 Obesidade e Doenças do fígado

O aumento dos casos de obesidade e de síndrome metabólica corrobora os altos índices de pacientes com doenças que acometem o fígado, como a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica (SANTOS *et al.*, 2021). Essa doença atinge pessoas de ambos os sexos, de todas as etnias e idades e estima-se que em 2025, cerca de 840 milhões de seres humanos sejam acometidos por essa enfermidade, na qual a obesidade estará associada a 95% dos casos. A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de gordura dentro do hepatócito superior a 5 % de sua massa ou volume, concomitante ao extravasamento de enzimas hepáticas, sendo o diabetes *melittus* e a dislipidemia apontados como fatores de risco para a gênese dessa condição. Assim, quando há um desequilíbrio no metabolismo glicídico, que ocasiona resistência à insulina, há também um desequilíbrio no metabolismo lipídico, acarretando deposição de gordura no fígado por redução da oxidação de ácidos graxos livres, ou aumento da lipogênese hepática, ou ainda, por redução da exportação de lipídios para a circulação, na forma de VLDL (PORTELA *et al.*, 2013).

A DHGNA inicia-se com a esteatose hepática, que é caracterizada pelo acúmulo excessivo de lipídios nos hepatócitos, sem a presença de inflamação, e seus danos podem ser reversíveis. Porém, se esse acúmulo de lipídios não for controlado, a doença progride para um estágio mais grave, a esteatohepatite não alcoólica (EHNA), a qual apresenta associação entre esteatose, inflamação, morte celular e fibrose, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), sendo estes dois últimos processos irreversíveis, como representado na Figura 2 (CHAVES *et al.*, 2012).

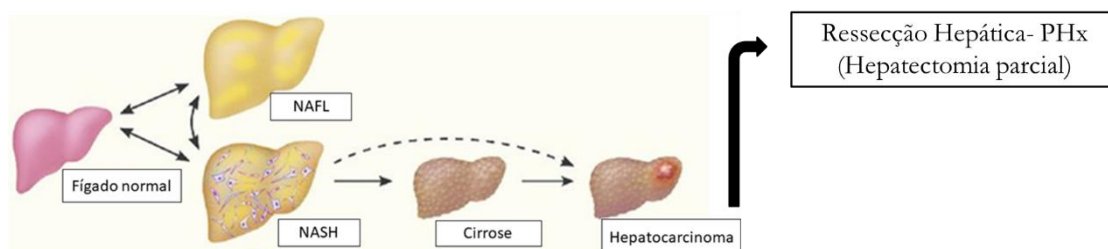


Figura 2 – Evolução da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) adaptado de TRAUNER *et al.*, 2010.

1.4 Hepatectomia e Regeneração hepática

Considerando a evolução da DHGNA para casos mais graves, a única possibilidade de preservar a função hepática é a retirada de parte do órgão, através de uma cirurgia de ressecção, conhecida como hepatectomia parcial (PHx). A cirurgia, descrita por Higgins e Anderson em 1931, consiste na ressecção dos lóbulos esquerdo e médio, que correspondem a aproximadamente 70% da massa hepática total. Os lóbulos lateral direito e caudado, que correspondem, respectivamente, a cerca de 24% e 6% da massa hepática total, são mantidos intactos (SALOMÃO *et al.*, 2012) e a sobrevivência do indivíduo depende de sua capacidade de regeneração hepática (RH) (BELLENTANI *et al.*, 2010). Casos de ressecção correspondente a 90% do tecido hepático também podem ser uma alternativa, mas a taxa de sucesso da cirurgia mostra-se muito reduzida (TRUANT *et al.*, 2013).

É importante salientar que os lóbulos ressectados durante a hepatectomia não se regeneram, são os lóbulos remanescentes que se expandem, até atingir a massa inicial do tecido (FAUSTO, 2001).

A regeneração hepática ocorre através de um processo compensatório de hipertrofia e hiperplasia celular, no qual todas as células hepáticas (hepatócitos, células endoteliais, de Kupffer, de Ito e ductais) proliferam para substituir a perda do tecido hepático, de modo a reestabelecer a sua massa (peso, volume) e suas funções. A primeira etapa da regeneração é a fase de iniciação, onde o fígado desenvolve um processo inflamatório que é desencadeado principalmente por citocinas, tais como a IL-6 e o TNF- α (ARAI *et al.*, 2003).

Em seguida, ocorre a fase de proliferação, onde fatores mitogênicos, como Fator de Crescimento do Hepatócito (HGF), Fator Transformador do Crescimento-Alfa (TGF- α), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), induzem a entrada dos hepatócitos no ciclo celular. Em roedores os sinais intracelulares relacionados à regeneração hepática são ativados dentro dos hepatócitos nas primeiras 2–5 horas após a

hepatectomia parcial. Esses sinais incluem a ativação de STAT3 (que é regulado por IL-6) e fator nuclear- κ B (NF- κ B) (que é regulado por TNF) (MICHALOPOULOS e BHUSHAN, 2021).

As células de Kupffer são as principais fontes de interleucina 6 (IL-6) e de fator de necrose tumoral α (TNF- α), produzidas pela ativação da via do NF- κ B, que sinaliza pelo receptor *Toll-like* 4 (TLR4) ou por C3a e C5a, componentes do sistema complemento. Estes componentes preparam os hepatócitos para reentrar no ciclo celular no primeiro estágio, levando os hepatócitos da fase G0 para a fase G1. A IL-6 se liga ao receptor de interleucina-6 (IL-6R) e o complexo IL-6 / IL-6R se associa a um co-receptor, a glicoproteína (gp) 130, levando à ativação de JAK / STAT, MAPK e PI3K / AKT. Nesta etapa, as células reagem aos fatores de crescimento e progridem para a fase S, onde ocorrerá a síntese de DNA. Depois disso, inicia-se a fase G2, onde são sintetizados fatores mitogênicos para a divisão celular, progredindo para a mitose. Por fim, as células terminam a proliferação sob o controle de fatores negativos, importantes para “frear” o processo, tais como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), conforme resumido na Figura 3 (TAO *et al.*, 2017; FITZGERALD *et al.*, 1995; MULLHAUPT *et al.*, 1994).

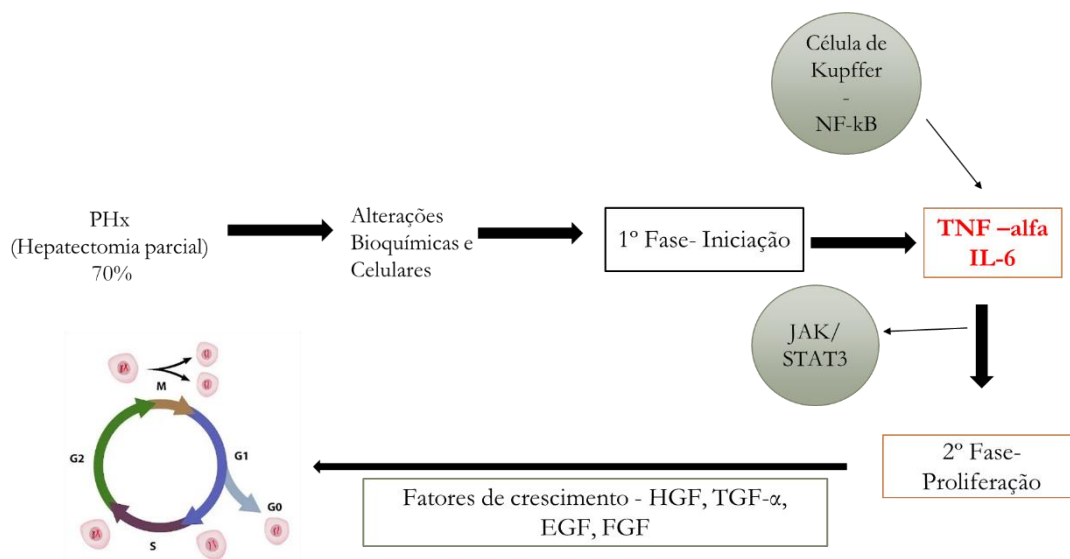


Figura 3 – Processo de Regeneração Hepática (autoria própria)

1.5 Obesidade e Regeneração hepática

A DHGNA tem grande impacto sobre a regeneração hepática. AMINI e colaboradores (2016) relataram que pacientes obesos ($\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$) tinham menor índice de regeneração hepática em relação a pacientes com IMC (índice de massa corpórea) normal ($18\text{-}25 \text{ kg/m}^2$), possivelmente decorrente da inflamação ocasionada pelo excesso de gordura hepática (AMINI *et al.*, 2016).

Para o controle adequado do processo inflamatório, o fígado conta com o apoio do sistema nervoso autônomo que inerva o parênquima hepático, como demonstrado na figura 4 (KAMIMURA *et al.*, 2018). Amplamente distribuída no sistema nervoso autônomo encontra-se a Acetilcolina (ACh), um mediador químico de sinapses presente no Sistema Nervoso Central, no Sistema Nervoso Periférico e na Junção Neuromuscular, fazendo parte do sistema de neurotransmissão colinérgica e atuando através de dois tipos de receptores: Muscarínicos e Nicotínicos (VENTURA, *et al.*, 2010).

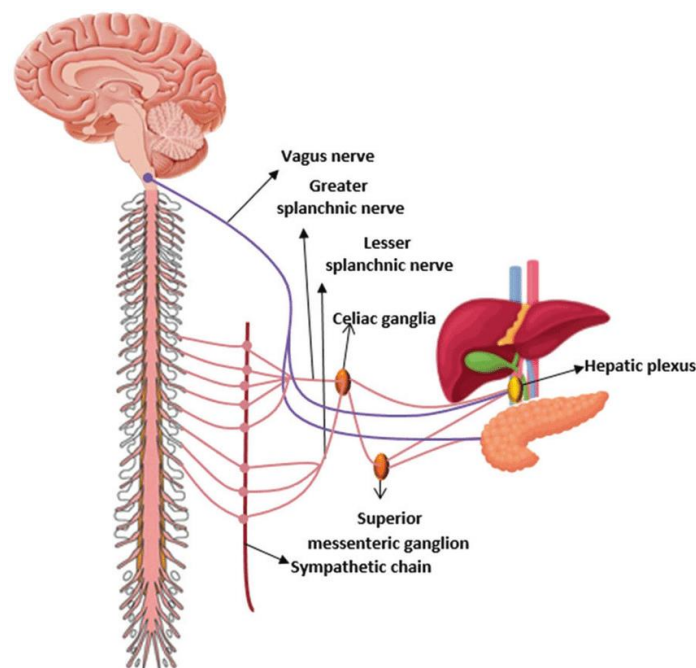


Figura 4 - Inervação autonômica hepática (TAN, *et al.*, 2020)

1.6 Sinalização Colinérgica e Receptor $\alpha 7\text{nAChR}$

Os receptores nicotínicos são canais iônicos presentes na membrana plasmática de algumas células, cuja abertura é disparada pelo neurotransmissor acetilcolina, tornando a membrana permeável aos íons Na^+ e K^+ (BATISTA, 2016). Estes receptores estão distribuídos em células que compõem diversos

tecidos do organismo e são constituídos por cinco subunidades proteicas: α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$), β ($\beta 2$ - $\beta 4$), γ , δ e ϵ . Os que estão presentes nos músculos são heteropentâmeros constituídos por subunidades α , β , γ , δ e ϵ e os do cérebro são formados por várias subunidades $\alpha 2$ -10 e $\beta 2$ -4. Estes receptores neuronais são constituídos por uma estequiometria geral de $2\alpha 3\beta$. Porém, $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$ podem formar homo-oligômeros constituídos por um único tipo de subunidade (VENTURA, *et al.*, 2010).

O presente estudo tem como foco o receptor homo-oligômero do tipo $\alpha 7$, o qual é expresso em todo sistema nervoso central e tem papel fundamental na resposta anti-inflamatória (LI *et al.*, 2018). A ativação do receptor $\alpha 7$ nAChR, presente em macrófagos residentes, pode suprimir a inflamação local, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (ZHOU *et al.*, 2015). O $\alpha 7$ também apresenta uma dessensibilização rápida e reversível e sua ativação promove um aumento da permeabilidade celular ao cálcio (VENTURA *et al.*, 2010).

Como dito anteriormente, quando o fígado sofre algum dano mecânico, o passo inicial da regeneração é a inflamação. Durante esse processo inflamatório, as fibras sensitivas do nervo vago iniciam uma resposta estimulada pela liberação de mediadores, como o TNF- α e IL-1 β . Esses estímulos são transmitidos ao sistema nervoso central, via braço aferente do nervo vago, os quais retornam através do braço eferente estimulando os neurônios a liberarem ACh que, ao se ligar aos receptores nicotínicos $\alpha 7$ expressos em macrófagos e outros tipos celulares, inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias no fígado evitando que haja dano tecidual (WANG, ZHOU, YAO, 2009; JOHNSTON, WEBSTER, 2009).

A inflamação caracterizada pela liberação de fatores solúveis, incluindo quimiocinas e citocinas, além da ativação das células imunes, é considerada parte integrante da DHGNA e várias linhas de evidência sugerem que o direcionamento da inflamação é uma ferramenta promissora para o gerenciamento dessa enfermidade. Assim o aumento da expressão de $\alpha 7$ nAChR no tecido hepático pode inibir a produção de citocinas pelas células de Kupffer, através das vias NF- κ B e ERK, como demonstrado na figura 5 (ZHOU *et al.*, 2015). Além disso, há estudos que mostram o aumento da expressão de $\alpha 7$ nAChR no tecido hepático de camundongos com DHGNA decorrente do

consumo de dietas ricas em gordura (HFD), sugerindo a participação desse receptor na resposta à inflamação induzida pela dieta (LI *et al.*, 2018).

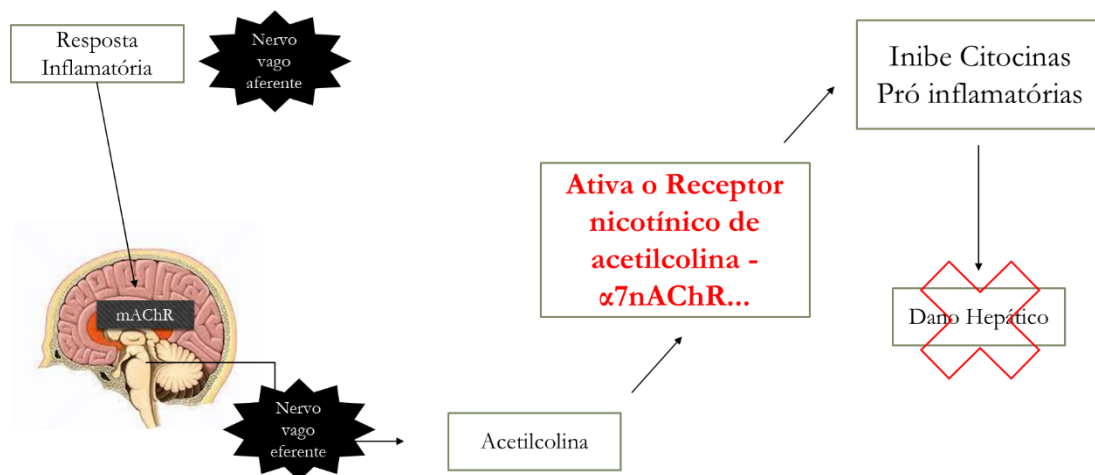


Figura 5 - Demonstração da via anti-inflamatória colinérgica, Autoria própria.

1.7 Sinalização colinérgica e AMPK

Os mecanismos moleculares da patogênese da esteatose e sua progressão ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que desempenha papel fundamental no controle energético do organismo, pode estar envolvida nesse processo. Essa proteína é ativada por redução nos níveis de adenosina trifosfato (ATP), levando à inativação das vias metabólicas que consomem ATP, como as vias anabólicas de síntese de ácidos graxos e colesterol, e estimulação das vias metabólicas que produzem ATP, como as vias catabólicas de oxidação de glicose e ácidos graxos, ocasionando aumento do processo de respiração celular e da produção de ATP pela mitocôndria (CASTRO, BIZZI e JUNIOR, 2020).

A AMPK tem ação pleiotrópica em diferentes tecidos. No tecido muscular esquelético, esta enzima promove o aumento da captação de glicose de maneira independente de insulina, estimulando o aumento da expressão dos receptores de glicose (GLUT4) na superfície celular, facilitando a internalização da glicose

e a produção de energia pela célula. No tecido hepático estimula a glicólise e reduz a síntese do glicogênio, resultando na produção de ATP e piruvato (substrato para a respiração celular) (BARROS e NUNES, 2019). Além disso, é considerada reguladora central da homeostase lipídica no fígado, atuando na inibição da expressão de genes lipogênicos, como ACC e FAS, através da modulação do fator de transcrição SREBP1c (SINHA-HIKIM, SINHA-HIKIM e FRIEDMAN, 2017; SANTOMAURO *et al.*, 2008).

A AMPK também modula negativamente a atividade da mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), uma proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos. A mTOR é formada por dois complexos proteicos distintos, conhecidos como complexo mTOR 1 (mTORC1) e complexo mTOR 2 (mTORC2), enquanto o mTORC1 regula o crescimento celular e o metabolismo o mTORC2 controla a proliferação e a sobrevivência celular. A sinalização do mTORC1 é ativada no tecido adiposo na obesidade e participa do aumento da deposição lipídica e da expansão deste tecido. Além disso, quando a glicemia está elevada, há secreção de insulina pelo pâncreas, ativando a AKT e mTORC1, aumentando a transcrição e a clivagem de SREBP1c (MAGDALON e FESTUCCIA, 2017) (Figura 6).

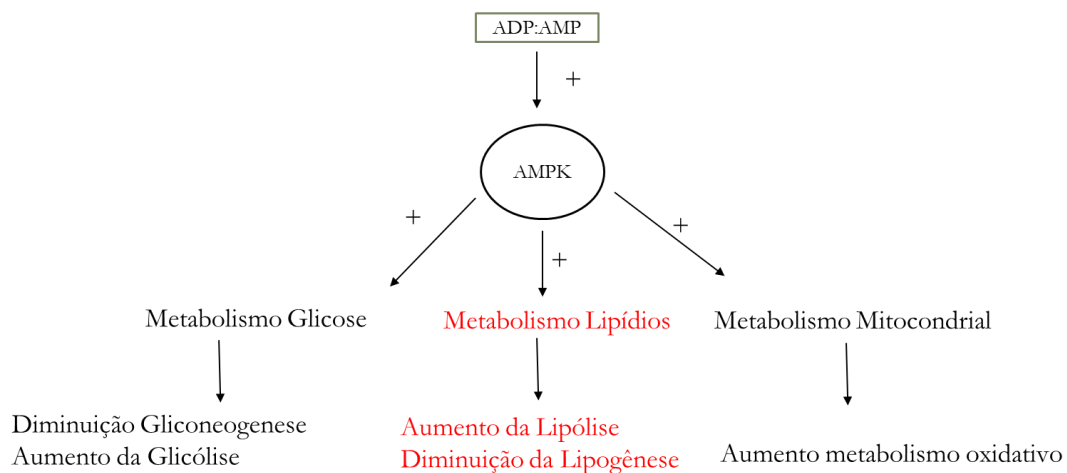


Figura 6 – Ativação da AMPK e seus efeitos no organismo. Autoria Própria.

Além da ativação clássica da AMPK, por processos fisiológicos já conhecidos do organismo, diferentes enfermidades como obesidade, Diabetes Mellitus e DHGNA podem modular a expressão e ativação desta enzima podendo resultar em resistência à insulina. A insulina age no fígado através do

bloqueio da gliconeogênese e glicogenólise, estimulando o acúmulo de glicogênio por meio da glicogênese hepática. Após estímulo com insulina, a AKT fosforila e inativa a GSK-3, que diminui a fosforilação da glicogênio-sintase e, por consequência, o aumento de sua atividade (CARVALHEIRA, ZECCHIN e SAAD, 2002) promovendo assim a síntese de glicogênio no fígado.

Nesse sentido, um estudo recente sugeriu que a ativação da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7nAChR$), mediada pelo agonista seletivo PNU, foi capaz de reduzir a esteatose hepática induzida por HFD, através da ativação da AMPK, suprimindo indiretamente a lipogênese no tecido (HASAN *et al.*, 2018). A AMPK pode ser ativada farmacologicamente por meio de fármacos como a metformina, cujo mecanismo de ação consiste em: i) reduzir a produção da glicose hepática através da inibição da gliconeogênese e glicogenólise e ii) melhorar a captação e utilização da glicose no músculo, através do aumento da sensibilidade à insulina. Além disso, ela inibe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, o que reduz o ATP e ativa a AMPK, que por sua vez inibe a proteína mTOR, levando a uma redução na síntese de proteínas e no crescimento celular (CASTRO, BIZZI e JUNIOR, 2020). Assim esse fármaco normaliza as concentrações elevadas de glicose no sangue, por sua propriedade anti-hiperglicêmica, além de não aumentar os níveis plasmáticos de insulina e não ser hipoglicemiante, mesmo em doses consideráveis (NETO *et al.*, 2015).

Estudos demonstraram que a ativação da AMPK, através da metformina, é fundamental para reduzir as concentrações de lipídios no organismo, uma vez que esta enzima fosforila e inativa a ACC e a HMG-CoA redutase em células hepáticas, aumentando assim a oxidação dos ácidos graxos no hepatócito e, consequentemente, diminuindo a esteatose hepática, bem como melhorando a sensibilidade do fígado à insulina (SANTOMAURO *et al.*, 2008; ZANG *et al.*, 2004).

Dietas que produzem estímulos inflamatórios desencadeiam a redução da fosforilação da AMPK e da atividade da subunidade $\alpha 2$ desta enzima. Quando essa proteína é ativada há uma redução na secreção do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e do fator de necrose tumoral α (TNF- α) em macrófagos. Alguns autores afirmam que camundongos alimentados com HFD e tratados com metformina obtiveram melhora no metabolismo glicídico em comparação com camundongos

alimentados com HFD, sem o tratamento com metformina (LYONS e ROCHE, 2018; JING *et al*, 2018).

Além disso, estudos demonstram que há relação entre função mitocondrial e ativação da AMPK. A biogênese mitocondrial ocorre em resposta ao aumento do gasto energético que eleva a demanda pela produção de ATP. Este fenômeno ocorre através do crescimento e divisão de mitocôndrias pré-existentes com o auxílio da regulação positiva das proteínas mitocondriais e um aumento na síntese de lipídios. A função das mitocôndrias como a principal fonte de produção de ATP na célula, corrobora a reestruturação da homeostase do ATP através da ativação da AMPK. Quando há um defeito nas funções mitocondriais, incluindo aqueles ocasionados pelo uso de inibidores de complexos da cadeia respiratória, ocorre a ativação da AMPK, à semelhança do efeito causada pelo fármaco metformina, conforme demonstrado na figura 7 (HERZIG E SHAW, 2018).

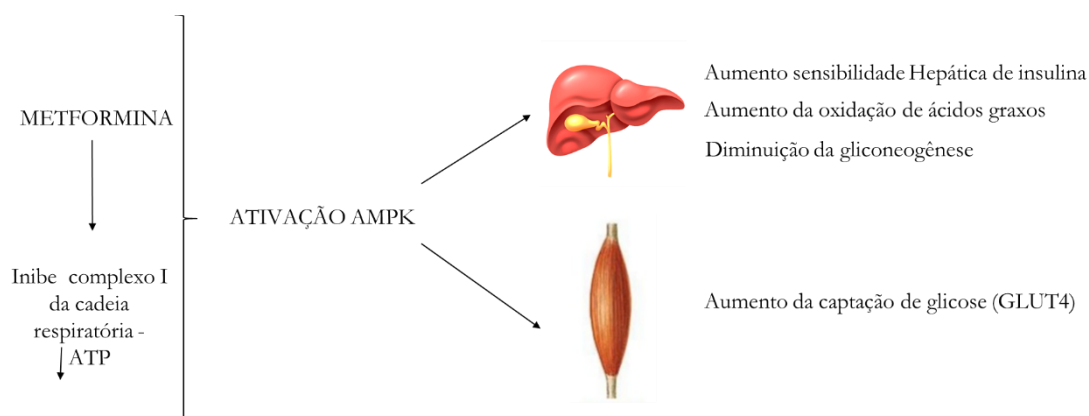


Figura 7 – Ações farmacológicas da metformina na célula hepática, adaptado de RENA *et al.*, 2013.

Sumarizando, o fígado é o único órgão com capacidade regenerativa após insulto mecânico, como a ressecção cirúrgica de dois terços da massa total desse órgão. Essa capacidade tem sido alvo de pesquisas, pois esse processo permite o crescimento compensatório do fígado. Nesse contexto, a capacidade de regeneração hepática vem sendo estudada no curso da doença hepática gordurosa não alcoólica. A patogênese dessa doença está intimamente relacionada às desordens metabólicas, como a obesidade e o diabetes mellitus.

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK), responsável pela manutenção da homeostasia energética, parece ter papel importante no controle da progressão da doença. Uma vez ativada, a AMPK exerce efeitos sobre o metabolismo da glicose e dos lipídios, tanto no que se refere à expressão gênica, quanto à síntese proteica. Essa enzima atua em diversos órgãos, incluindo fígado, onde tem um papel essencial sobre diversas cascatas celulares, em especial sobre enzimas-chaves na síntese de triglicérides e de colesterol. Além de atuar no fígado, ela atua no sistema nervoso, sendo uma das principais enzimas moduladoras das sinalizações hormonais e nutricionais. Pesquisadores sugerem que a presença, bem como a ativação da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) seja capaz de reduzir a esteatose hepática induzida por HFD, por melhorar a sinalização de AMPK, levando à supressão na lipogênese.

Dentro desse contexto, não há na literatura estudos que mostrem a relação da ativação de AMPK, dependente da sinalização mediada pelo receptor $\alpha 7$ nicotínico, sobre a capacidade regenerativa do fígado após insulto mecânico em modelos animais com obesidade decorrente do consumo de dieta hiperlipídica. Neste sentido, foi de nosso interesse analisar se possíveis danos hepáticos em nossos modelos experimentais, causados por insulto mecânico concomitante à ingestão de dieta rica em gordura, modulam o receptor $\alpha 7$ nAChR, que por sua vez ativa a AMPK, regulando a resposta inflamatória no fígado após a PHx, reduzindo assim a produção de citocinas pró-inflamatórias de forma a auxiliar na regeneração hepática.

Experimentos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que camundongos adultos *knockout* para o receptor $\alpha 7$ nAChR, alimentados com ração comercial (dieta controle) mantiveram a capacidade de regenerar o fígado após insulto mecânico. No entanto, quando esses animais eram alimentados com dieta hiperlipídica por cerca de um mês e, posteriormente submetidos à ressecção hepática, observou-se um menor índice de regeneração hepática (dados não publicados).

Dessa forma, o presente projeto pretendeu avaliar o papel do receptor $\alpha 7$ nicotínico e sua relação com a proteína quinase ativada por AMP na regeneração hepática de camundongos *knockout* para $\alpha 7$ nAChR alimentados

com dieta hiperlipídica submetidos à hepatectomia parcial (2/3 PHx) tratados ou não com metformina.

1. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar o papel do receptor $\alpha 7$ nicotínico e sua relação com a proteína quinase ativada por AMP na regeneração hepática de camundongos *knockout* para $\alpha 7$ nAChR alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à hepatectomia parcial (2/3 PHx) tratados ou não com metformina.

1.2 Específicos

- Avaliar a capacidade de regeneração hepática, induzida por insulto mecânico (2/3PHx), em camundongos adultos machos *knockout* para o receptor $\alpha 7$ nAChR alimentados com HFD;

- Avaliar a taxa de sobrevivência e a função mitocondrial de camundongos adultos machos após 2/3PHx.

- Avaliar a modulação das proteínas AMPK no tecido hepático, bem como proteínas das vias de sinalização do receptor $\alpha 7$ nAChR, como JAK e STAT3, antes e após o procedimento de 2/3PHx, em camundongos adultos machos *knockout* para o receptor $\alpha 7$ nAChR, alimentados com HFD;

- Avaliar o efeito do tratamento com agonista de AMPK (metformina) sobre a capacidade de regeneração hepática induzida por insulto mecânico (2/3PHx) em camundongos adultos machos *knockout* para o receptor $\alpha 7$ nAChR alimentados com HFD.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas, CEUA 5686-1. Os princípios Éticos para uso de Animais de Laboratório, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) foram rigorosamente seguidos, assim como a legislação nacional vigente, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

3.2 Modelos animais empregados nos protocolos experimentais

Para avaliar o papel do receptor $\alpha 7$ nAChR no modelo proposto (Figura 8), foram utilizados camundongos *knockouts* (KO) para $\alpha 7$ nAChR e camundongos Selvagens/*Wild Type* (WT) C57/BL-6, machos provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), ambos com 21 dias de vida, os quais foram alimentados com ração comercial ou dieta hiperlipídica (AIN93 45 %) durante as 4 semanas de vida que antecederam a cirurgia. Durante o período de tratamento os animais foram mantidos no biotério com acesso a água e alimentação *ad libitum* e ciclo de luz (claro/escuro) de 12 horas. Para avaliar o efeito do tratamento com agonista de AMPK sobre a capacidade de regeneração hepática, uma parte dos animais, alimentada com dieta HFD, recebeu tratamento com metformina via oral (5 mg/dL) pelas mesmas 4 semanas que antecederam a cirurgia, enquanto os demais receberam apenas veículo (água filtrada).

Após esse período os grupos foram submetidos ao procedimento de PHx. Os lóbulos esquerdos e parte do médio foram seccionados durante a cirurgia; além disso, esses animais foram avaliados por 7 dias quanto à sobrevivência. Ao final dos 7 dias, os animais sobreviventes, foram anestesiados e eutanasiados. Os lóbulos direito e caudado, bem como o sangue dos animais foram coletados para análises posteriores.

Para avaliar a função hepática, os animais foram submetidos ao teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato (ipPTT) antes da PHx e após PHx, além da análise de respirometria de alta resolução (OrosBoros) (Figura 8).

Os grupos receberam as seguintes denominações: CT WT (animais do tipo selvagem, alimentados com ração comercial), CT KO (animais *knockouts* (KO) para $\alpha 7nAChR$, alimentados com ração comercial); WT (animais do tipo selvagem, alimentados com HFD), KO (knockouts (KO) para $\alpha 7nAChR$, alimentados com HFD), WT+met (animais do tipo selvagem, alimentados com HFD e com administração de metformina) e KO+met (knockouts (KO) para $\alpha 7nAChR$, alimentados com HFD e com administração de metformina).

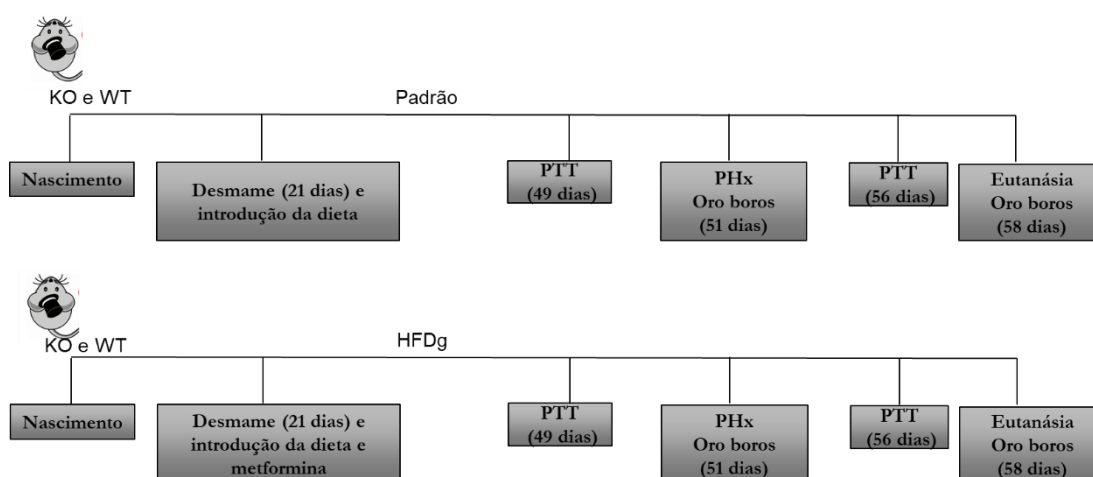


Figura 8 - Protocolos experimentais utilizados no estudo. Autoria própria.

3.3 Dietas

A dieta hiperlipídica foi preparada, usando como referência a dieta para roedores AIN-93 para crescimento, para a indução da obesidade. À dieta foi acrescida de banha de porco em uma proporção de 45 % em relação ao valor calórico final, conforme descrição da Tabela 1. A dieta controle utilizada foi a ração comercial Nuvilab® CR-1, cuja composição fornecida pelo fabricante está especificada na Tabela 2.

Tabela 1: Composição nutricional da dieta hiperlipídica empregada no protocolo experimental.

Ingrediente	AIN93-G 45%		
	Quantidade	Kcal	% do total calórico
Amido	95	380	35,26
Farinha de trigo	0	0	
Maltodextrina	125	500	
Sacarose	201	804	
Caseína	233	932	19,51
Óleo de soja	40	360	45,23
Banha	200	1800	
Minerais	35	0	
Vitaminas	10	0	
Fibras	55,5	0	
L-cistina	3	0	
Bit. de colina	2,5	0	
TOTAL	1000	4776	100

Tabela 2: Composição da dieta controle empregada no protocolo experimental, segundo embalagem.

Componente	Quantidade
Umidade (máx)	125g/kg
Proteína bruta (min)	220g/kg
Extrato etereo (min)	50g/kg
Matéria mineral (máx)	90g/kg
Fibra bruta (máx)	70g/kg

3.4 Indução de regeneração hepática por hepatectomia parcial (PHx)

Para avaliar a capacidade regenerativa do fígado, o procedimento de PHx foi realizado e cerca de 70 % do fígado foi retirado para induzir a regeneração do órgão, seguindo o protocolo descrito por Mitchell e Willenbring (2008), ilustrado na Figura 9.

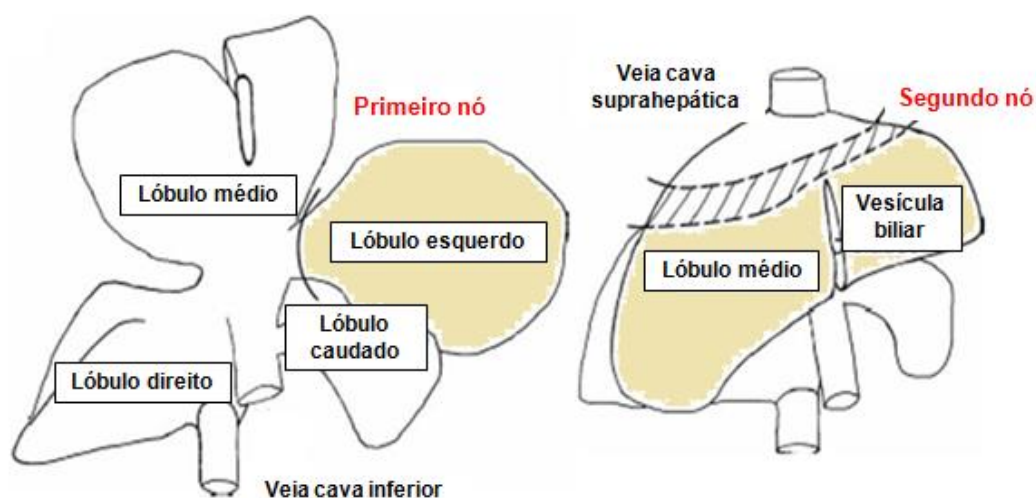


Figura 9: Desenhos esquemáticos da anatomia do fígado de camundongos e posicionamento dos nós para remoção dos lóbulos. Adaptado de Mitchell e Willenbring, 2008.

Para tanto, camundongos foram mantidos em anestesia com uma mistura de isoflurano e oxigênio (2 %: 2 L/min). A seguir foi realizado uma incisão abdominal de cerca de 3 cm, expondo o fígado. O lóbulo lateral esquerdo foi amarrado por um nó com linha de sutura não-absorvível e foi totalmente removido, usando tesoura microcirúrgica. Em seguida, o lóbulo médio foi amarrado em cerca de 1/3 de seu total, novamente com linha cirúrgica não-absorvível, e a porção abaixo do nó foi removida usando tesoura microcirúrgica (nesse caso, usando a vesícula biliar como referência para localização exata da porção a ser retirada). O músculo abdominal foi suturado com agulha e linha cirúrgica, assim como a pele. Os animais receberam analgesia logo após a cirurgia e a cada 24 hs até o sacrifício (carprofeno - 10mg/kg de peso corpóreo). Os animais foram avaliados por 7 dias quanto à sobrevivência. Ao final dos 7 dias, os animais sobreviventes, foram anestesiados e eutanasiados.

3.5 Anestesia

Para a realização dos experimentos de extração de tecidos os camundongos foram anestesiados com uma diluição de Quetamina de Sódio, Xilazina e Diazepam, respectivamente na proporção de 3:2:2. Para a cirurgia de PHx foi utilizada a anestesia inalatória com isoflurano, conforme descrito anteriormente.

3.6 Respirometria de alta resolução (Oroboros)

Para determinar as taxas de consumo de oxigênio com Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria), as mitocôndrias foram isoladas do fígado de camundongos *knockout* (KO) para $\alpha 7nAChR$ e camundongos *Wild Type* (WT) C57/BL-6. Parte do Fígado coletado, tanto no momento da PHx quanto na eutanásia, foi lavada em MIR05 gelado (110 mM de sacarose, 60 mM de K-lactobionato, 0,5 mM de EGTA, 3 mM de MgCl₂, Taurina 20 mM, KH 10 mM 2 PO₄, HEPES 20 mM, pH 7,1 a 30 °C e BSA 0,1 %) e o peso úmido do tecido foi mensurado. O tecido foi cortado com uma pequena tesoura e suspenso em cinco vezes seu peso úmido em MIR05 e então processado usando um homogeneizador Potter com 8-10 golpes a 1000×g. O homogenato foi transferido para um falcon contendo 20 mL de tampão de isolamento (sacarose 320 mM, EDTA 1 mM, TRIS 10 mM, pH 7,4 com HCl) e centrifugado por 10 min a 1000×g, 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado por 10 min a 6200×g, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado suavemente com tampão de isolamento gelado. O *pellet* foi ressuspenso em aproximadamente 200 µL de MIR05. Para medir a respiração dependente do complexo I mitocondrial (estado 3), os reagentes ADP (2 mM), piruvato (5 mM), malato (2 mM) e glutamato (20 mM) foram adicionados às mitocôndrias no tampão de respiração MIR05. A respiração combinada do complexo I e do complexo II foi avaliada pela adição de succinato (10 mM). Posteriormente, o acoplamento mitocondrial foi avaliado pela inibição do complexo I pela adição de Rotenona (Rot), inibição do complexo III pela adição de antimicina A (AmA) e inibição da ATP sintase pela adição de oligomicina –

(OmY, 1,5 mg / mL) (estado 4) e o desacoplamento por uma titulação de p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP) de carbonilcianeto de múltiplas etapas.

3.7 Determinação sérica de Alanina Amino Transferase (ALT) e Aspartato Amino Transferase (AST)

As amostras de sangue foram extraídas dos animais e centrifugadas a 3500 rpm por 30 minutos para separação do soro. A determinação da atividade enzimática foi realizada utilizando os kits ALT/GLP e AST/GOT (Bioclin), conforme instruções do fabricante.

3.8 Avaliação da função hepática pela determinação do teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato (ipPTT) e determinação de albumina e bilirrubina

A função hepática foi avaliada através do teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato usando um glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, Basel, Suíça). Os camundongos foram deixados em jejum prévio de 12h. O piruvato (2g / Kg de uma solução de piruvato de sódio a 20 %) foi injetado por via i.p. e as amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração. A área sob a curva da glicemia em função do tempo foi calculada acima de cada linha de base individual.

Albumina e bilirrubina foram determinadas em amostras de soro dos mesmos animais experimentais, utilizando kit específico (Bioclin), seguindo as orientações do fabricante.

3.9 Determinação hepática de triacilgliceróis (TG)

Fragmentos de fígado contendo cerca de 50mg foram coletados, adicionados de álcool isopropílico e lisados em homogeneizador Bead ruptor. As amostras foram centrifugadas a 5.500 rpm por 10min a 4°C e o sobrenadante utilizado para a dosagem. O conteúdo de triacilgliceróis foi dosado utilizando kit específico para TG (Bioclin), seguindo as orientações do fabricante.

3.10 Real-time PCR quantitativo (qRT-PCR)

Fragmentos de fígado foram coletados para avaliação da expressão dos genes de interesse. O RNA total foi extraído utilizando o reagente RNazol (Sigma-Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante e quantificados utilizando equipamento NanoDrop ND-2000. A transcrição reversa foi realizada, utilizando o RNA total, através do *High-Capacity* cDNA Reverse Transcription Kit. A expressão relativa foi determinada utilizando o sistema Taqman e os primers para os seguintes alvos: alpha-7, IL1B, IL6 e IL10. Como controle endógeno, foi utilizado ACTB. Cada PCR continha 20ng de DNA complementar e foi realizado na plataforma ABI Prism 7500 Fast. Os dados foram expressos como valores relativos, determinados pelo método de comparação dos threshold cycle ($2^{-\Delta Ct}$), de acordo com a recomendação do fabricante.

3.11 Western Blotting

Fragmentos de tecido hepático sadio remanescente foram coletados para avaliar as proteínas envolvidas com as vias de proliferação celular. Para o processamento das amostras, os tecidos foram solubilizados em tampão de extração (EDTA 10mM; Trisma base 100mM; pirofosfato de Na 10mM; fluoreto de Na 100mM; ortovanadato de Na; PSMF 2 mM e aprotinina 0,1mg/mL) à 4°C, com o auxílio de um homogeneizador Beadruptor em velocidade máxima, por aproximadamente 10 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 11000 rpm por 30 minutos para a remoção de material insolúvel. Foram determinadas as concentrações de proteínas das amostras utilizando-se o Reativo de Biureto e, em seguida, elas foram ressuspensas em tampão de Laemmli (2μL de tampão/10μL de amostra) contendo β-mercaptoetanol. Para a análise por *imunoblotting*, 50μg de proteínas foram separadas em SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o aparato de mini gel da Bio-Rad. Após a transferência, foi aplicada uma solução bloqueadora nas membranas à base de leite desnatado a fim de diminuir a ligação inespecífica das proteínas.

Posteriormente, as membranas foram incubadas overnight, com anticorpos específicos: p-STAT3 (Cell Signaling Technology, #9145, 1:1000), STAT3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-482, 1:500), p-JAK (Tyr 1007/Tyr 1008) - R: sc-16566-R – Rb), JAK, p-AMPK ((Thr172) (40H9) mAb #2535 - Rb – Cell),

AMPK (#2532 - Rb – Cell), usando como controle endógeno β -actina (Abcam, ab8227, 1:1000). Em seguida, foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário. Após lavagem, as membranas foram expostas à solução reveladora SignalFire ECL Reagent (Cell Signaling Technology). O sinal foi detectado por quimioluminescência, em equipamento GeneGnome (Syngene). A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo software Scion Image (Scion Corporation).

3.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. A análise dos resultados foi realizada empregando-se Análise de Variâncias (ANOVA) *One-way*, *Two-way*, com nível crítico igual ou menor que 0,05. O *post-hoc* de Bonferroni foi empregado quando diferenças significantes foram detectadas. Os dados foram analisados utilizando os programas GraphPad Prism, versão 8 (GraphPad Software, Inc. USA).

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos da dieta rica em gordura saturada (hiperlipídica) e da hepatectomia sobre variáveis morformétricas

A figura 10 traz o perfil murinométrico dos grupos experimentais. Na Figura 10A é possível observar que os animais obtiveram um ganho de massa corporal progressivo ao longo das 4 semanas, independentemente da dieta a que foram submetidos. No entanto, observa-se diferença significativa da 2^a a 4^a semana entre WT e KO expostos à dieta hiperlipídica.

A diferença entre o ganho de peso inicial até o dia da PHx também foi significativa entre animais WT CT x WT e WT CT x KO CT, como observado na Fig. 10B. Pela figura, é possível observar que a diferença de ganho de peso entre os animais WT (CT e HFD) foi expressivo, como já esperado para animais sob consumo de dieta hiperlipídica. No entanto, apesar dos animais KO terem ganhado bastante peso, não foi observada diferença entre KO alimentados com dieta controle e dieta hiperlipídica. Como já esperado, os animais experimentais submetidos à ressecção hepática, apresentaram uma diminuição no ganho de peso depois da PHx, como observado na Fig. 10A e C. Pela figura é possível observar que a perda de peso foi maior para animais expostos à HFD, especialmente para aqueles do grupo WT, cuja diferença para WT CT extinguiu-se.

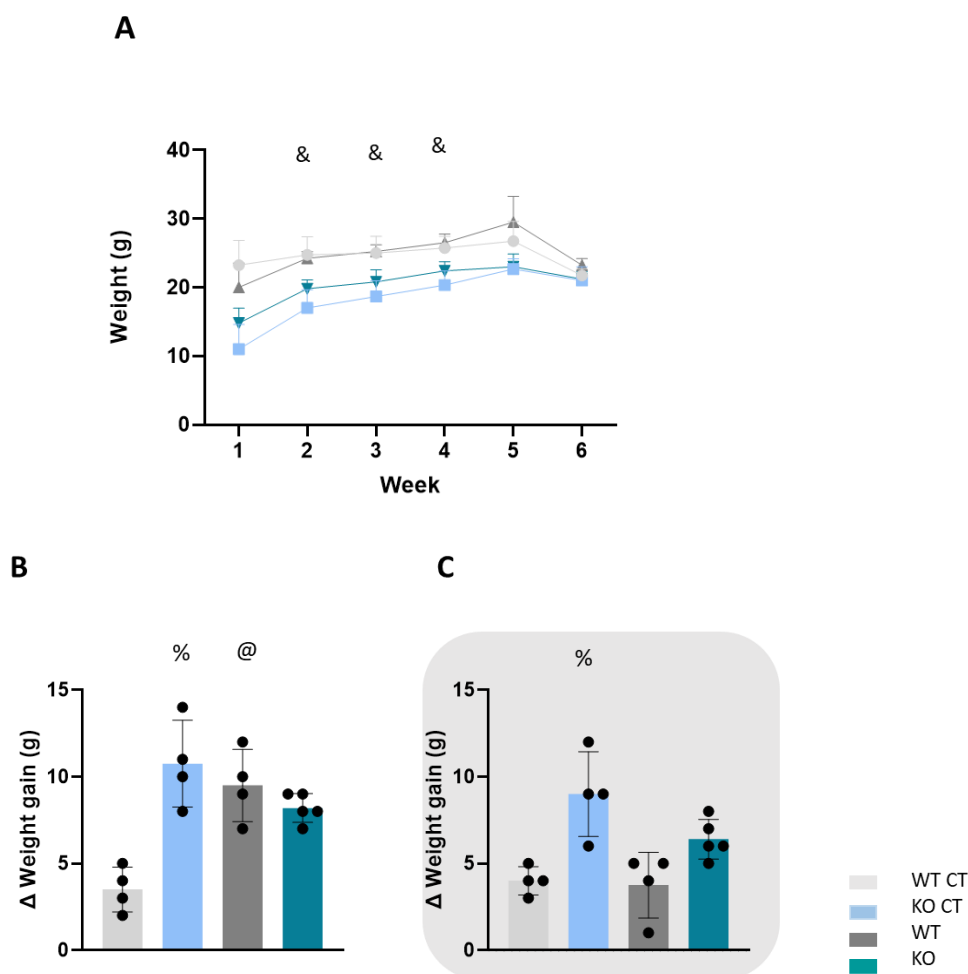


Figura 10: Perfil murinométrico dos grupos experimentais. (A) Evolução da massa corporal de camundongos machos durante 6 semanas. (B) Variação da massa corporal de camundongos machos até o dia da PHx. (C) Variação da massa corporal de camundongos machos até o dia da eutanásia. Two-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni (A); One-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni (B e C), $p < 0.05$ & WT vs. KO; % WT CT vs. KO CT e @ WT CT vs. WT.

Além do ganho de massa corporal, avaliamos a adiposidade retroperitoneal (Fig. 11B), epididimal (Fig. 11C) e índice hepatométrico (Fig. 11A), dos animais expostos à HFD e submetidos à PHx. Pela figura é possível observar uma tendência dos grupos KO (CT e HFD) e WT HFD terem maior adiposidade, quando comparados ao WT CT. No entanto, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

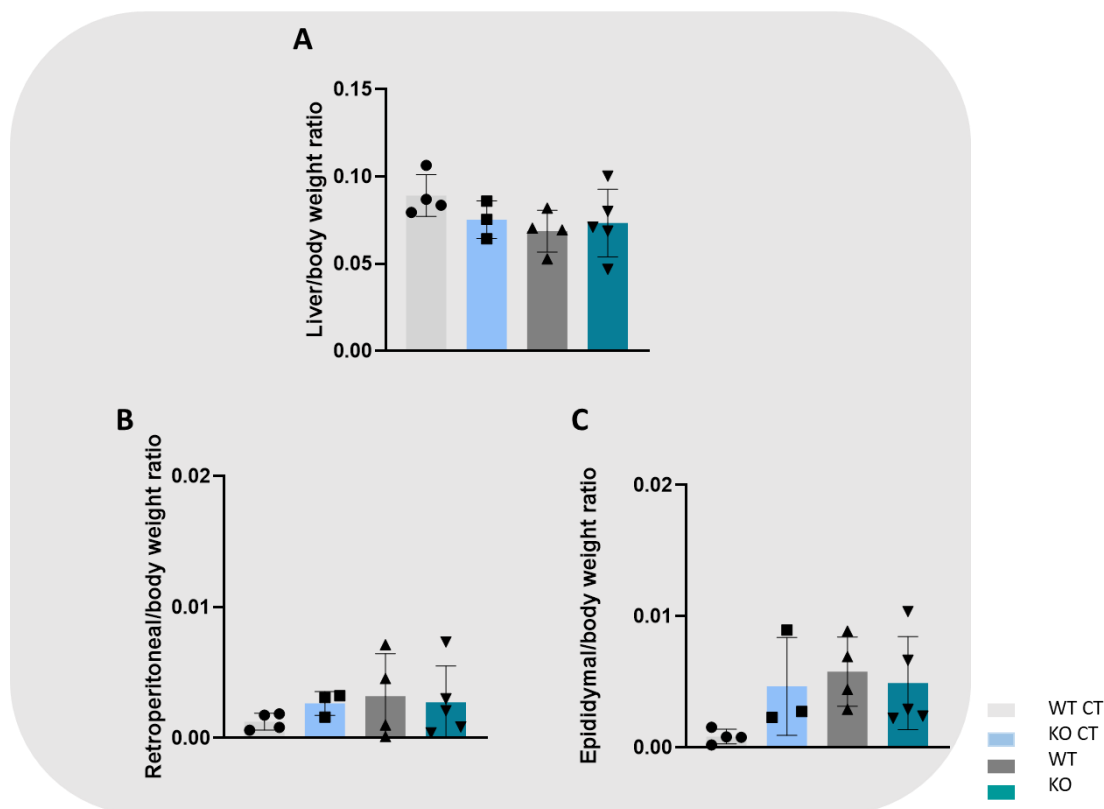


Figura 11: Adiposidade e índice hepatométrico. (B) Massa relativa de gordura retroperitoneal de camundongos machos; (C) Massa relativa de gordura epididimal de camundongos machos; (A) Índice Hepatométrico de camundongos machos. One-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni.

A análise da curva de sobrevivência dos animais dos grupos WT e KO, submetidos à PHx, é mostrada na Fig. 12. Pela figura é possível observar que a porcentagem de sobrevivência, avaliada ao longo de 7 dias após a cirurgia, foi maior em animais KO, tanto alimentados com dieta padrão, quanto para HFD, do que em animais WT, mostrando que, de alguma maneira, a ausência do receptor protege os animais e permite melhor regeneração do fígado.

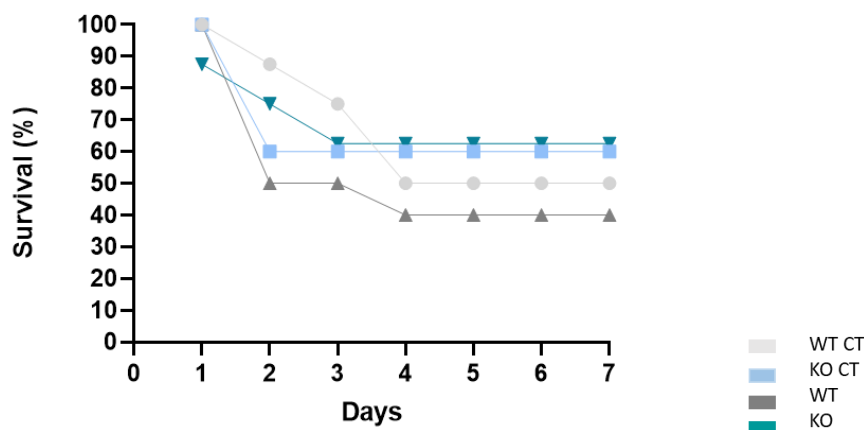


Figura 12: Porcentagem de animais machos que sobreviveram 7 dias após o procedimento de PHx.

Para determinar o efeito da ausência do receptor nicotínico $\alpha 7$ em animais alimentados com dieta hiperlipídica sobre a funcionalidade hepática, realizamos a avaliação da produção hepática de glicose através do teste de tolerância ao piruvato (ipPTT), antes e após PHx, como demonstrado na Fig. 13.

Pela figura é possível observar uma diferença na glicemia basal em jejum, antes da PHx (Fig. 13A) entre os grupos KO CT x KO e entre os grupos WT e KO alimentados com HFD. No entanto, ao longo do teste, não houve diferença na produção hepática de glicose em resposta ao piruvato antes da realização da hepatectomia parcial, independente do genótipo e da dieta, como confirmado pelo cálculo da área sob a curva (AUC) do PTT (Fig 13A).

Da mesma forma, após PHx, não foi observada diferença entre os grupos experimentais. No entanto, observa-se completa ausência de resposta do fígado dos animais dos quatros grupos experimentais ao piruvato, sugerindo que, mesmo após 7 dias de recuperação, o fígado dos animais submetidos à ressecção hepática não se mostrou capaz de restabelecer completamente a função metabólica.

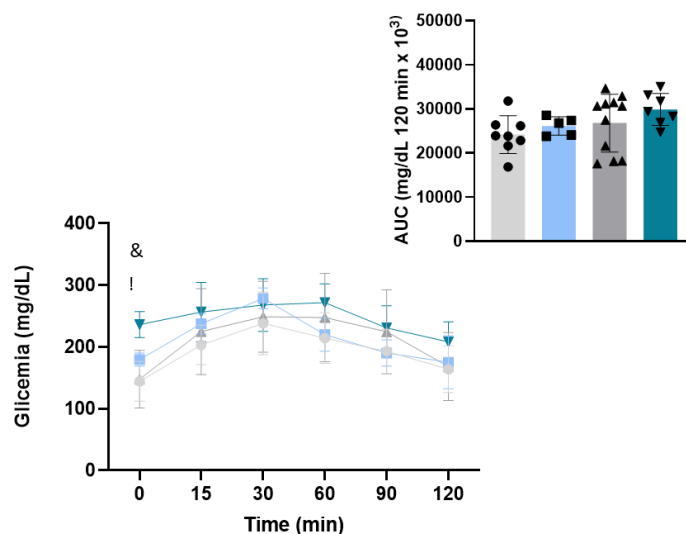
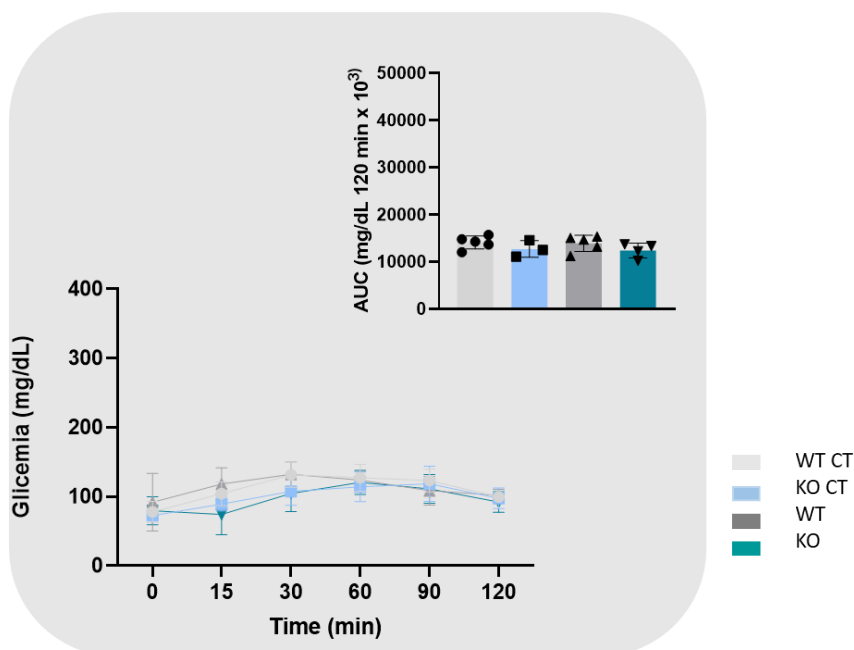
A**B**

Figura 13: Avaliação da função hepática pelo teste de tolerância ao piruvato. (A) Avaliação da função hepática pela determinação do teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato (ipPTT) antes da PHx e área sob a curva (AUC). (B) Avaliação da função hepática pela determinação do teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato (ipPTT) depois da PHx e área sob a curva (AUC). Two-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni; & $p < 0.05$, WT vs. KO e ! $p < 0.05$, CT KO vs. KO.

Após a eutanásia também realizamos a determinação de atividade sérica das enzimas hepáticas Alanina Amino Transferase (Fig.14A) e Aspartato Amino Transferase (Fig. 14B). Pelos resultados foi possível observar níveis elevados de atividade destas enzimas no soro, considerando que o valor de referência para essas enzimas em humanos saudáveis é ≤ 40 U/L, sugerindo possível lesão hepatocelular ou pontos de necrose, mesmo após 7 dias de recuperação. Entretanto, o grupo KO exposto à dieta hiperlipídica foi o grupo que apresentou menor valor de AST e ALT, comparado aos demais grupos, podendo representar uma diminuição da lesão hepática nos animais desse grupo. Também avaliamos os níveis séricos de bilirrubina (Fig.14D) e encontramos valores de Bilirrubina total e direta acima do considerado fisiológico, tendo como valor de referência para Bilirrubina direta até 0,3 mg/dL, Bilirrubina indireta até 0,8 mg/dL e Bilirrubina total até 1,2 mg/dL. O aumento concomitante dos níveis das aminotransferases em conjunto com a bilirrubina, sugere insuficiência hepática aguda após PHx. Avaliamos os níveis séricos de albumina (Fig.14C), e encontramos níveis diminuídos, considerando como valor de referência normal para humanos entre 3,5 g/dL e 5,0 g/dL. Esses achados sugerem possíveis lesões hepáticas devido a isquemia pós-cirúrgica.

Por fim, para avaliar o conteúdo de lipídios hepáticos, dosamos triglicerídeos no fígado de camundongos alimentados com dieta HFD e padrão, antes e após PHx (Fig. 14 E e F). Pelas imagens é possível observar uma tendência de aumento de TG hepático nos animais de ambos os grupos alimentados com HFD (WT e KO) antes da PHx (Fig 14E), bem como uma tendência de redução de TG hepático nos animais KO alimentados com HFD após PHx, em comparação aos demais grupos (Fig 14F), fato que corrobora os valores de transaminases séricas, podendo favorecer maior recuperação desses animais.

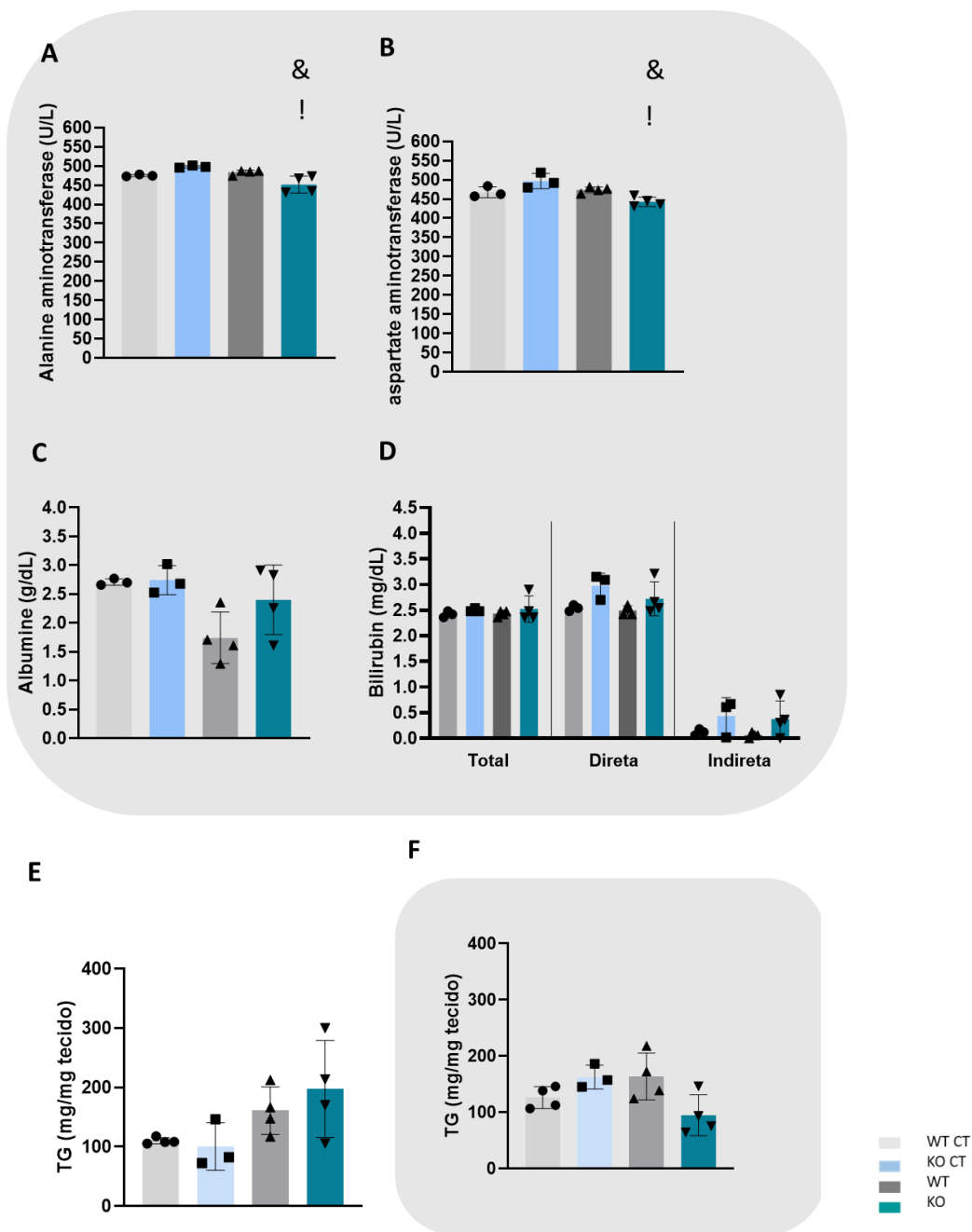


Figura 14: Determinação de lesão hepatocelular por testes bioquímicos (A) Dosagem de Alanina aminotransferase; (B) Dosagem de aspartato aminotransferase; (C) Dosagem de Albumina; (D) Dosagem de Bilirrubina; (E) Dosagem de triglicerídeos hepáticos antes da PHx; (F) Dosagem de triglicerídeos hepáticos depois da PHx. (G) Dosagem de Albumina em camundongos machos; (H) Dosagem de Bilirrubina em camundongos machos. One-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni (A, B, C, E, F) e Two-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni (D). & $p < 0.05$, WT vs. KO e ! $p < 0.05$, KO CT vs. KO

4.2 Efeitos do tratamento com metformina sobre a função hepática

O presente estudo também teve por objetivo avaliar o efeito do tratamento com metformina, um agonista da AMPK, sobre a capacidade de regeneração hepática, induzida por insulto mecânico (2/3PHx), em camundongos adultos machos *knockout* para o receptor $\alpha 7$ nAChR, em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Para isso, os animais expostos à dieta hiperlipídica tanto WT, quanto KO, foram subdivididos em dois grupos, onde metade passou a receber metformina (5 mg/dL) por via oral e a outra metade apenas veículo (água filtrada).

Como observado na Fig. 15A, todos os animais apresentaram um aumento de massa corporal progressivo ao longo das 4 semanas de exposição à dieta, sendo que observamos uma diferença estatística desde a 1^a semana de dieta, entre os animais WT e KO que receberam metformina. Como já esperado, os animais experimentais submetidos à ressecção hepática, apresentaram uma diminuição no peso depois da PHx, como observado na Fig. 15A, sendo significativamente diferente entre os animais machos WT e KO que receberam metformina. É importante destacar que a evolução do peso foi menor nos animais KO, independente do tratamento com metformina, uma vez que os animais KO partiram de um peso inicial menor. No entanto, a diferença estatística no ganho de peso foi observada apenas nos machos KO que receberam metformina, cujos valores apresentaram-se maiores em comparação ao WT tratado com metformina, tanto antes quanto após PHx (Fig 15B e C), mostrando uma proteção da perda de peso pós-cirúrgica promovida pela metformina.

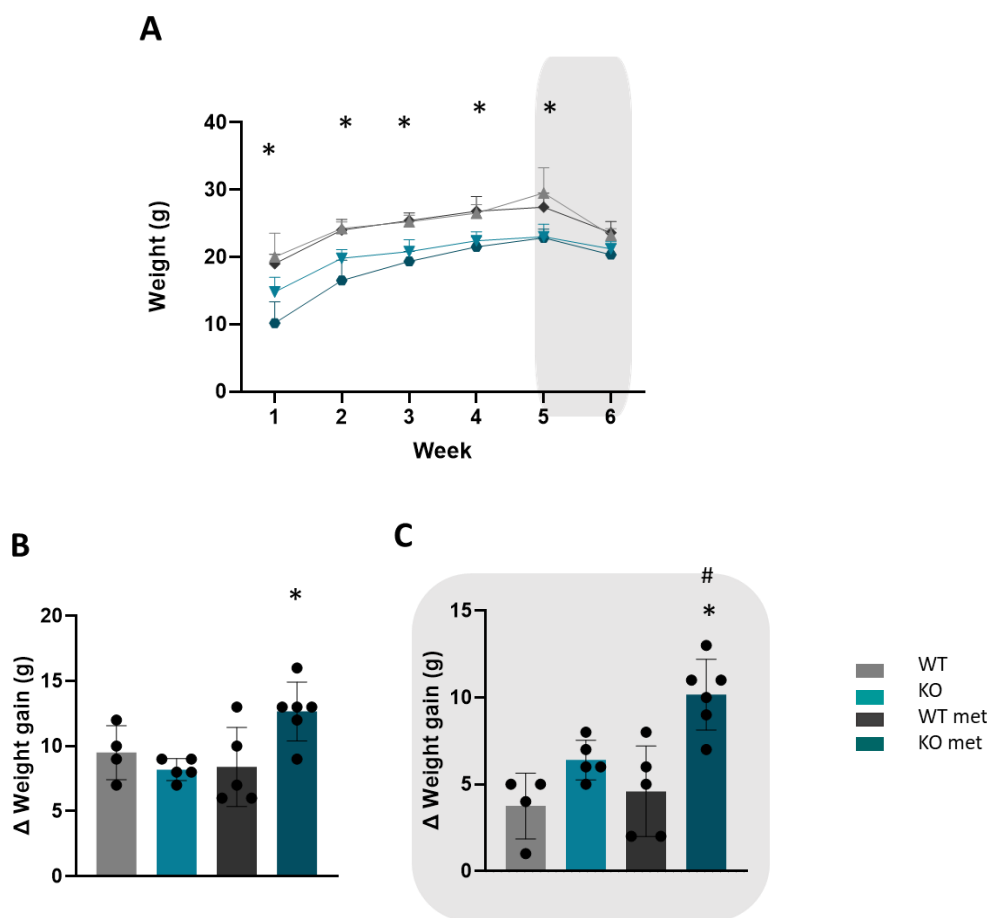


Figura 15: Perfil murinométrico dos grupos experimentais. (A) Evolução do peso corporal de camundongos machos alimentadas com dieta hiperlipídica (45 %) durante 6 semanas. (B) Variação do peso corporal de camundongos machos alimentadas com dieta hiperlipídica (45 %) até o dia da PHx. (C) Variação do peso corporal de camundongos machos alimentadas com dieta hiperlipídica (45 %) até o dia da eutanásia. Two-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni (A); One-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni (B e C), $p < 0.05$ * WT met vs KO met.

A análise da curva de sobrevivência dos animais dos grupos WT e KO, submetidos à PHx, é mostrada na Fig. 16. Pela figura é possível observar que a porcentagem de sobrevivência, avaliada ao longo de 7 dias após a cirurgia, foi 25% maior no grupo KO que recebeu o tratamento com metformina, em relação ao grupo KO não tratado, mostrando que a ativação da AMPK parece ser fundamental para garantir a sobrevivência em animais obesos que passaram por ressecção. Ainda, esse resultado reforça que a ausência do receptor interfere na sinalização da AMPK, mediando a regeneração hepática.

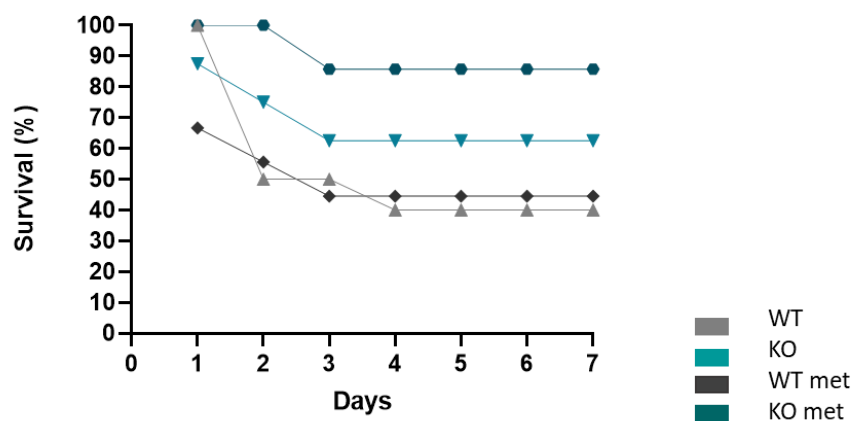


Figura 16: Porcentagem de animais machos que sobreviveram 7 dias após o procedimento de PHx

Para determinar o efeito da ausência do receptor nicotínico $\alpha 7$ em animais obesos sobre a funcionalidade hepática após PHx, e a dependência da AMPK nesse processo, realizamos a avaliação da produção hepática de glicose através do teste de tolerância ao piruvato (ipPTT), antes e após PHx, como demonstrado na Fig. 17.

É possível observar, uma maior produção hepática de glicose em resposta ao piruvato antes da realização da hepatectomia parcial, independente do genótipo e do tratamento. Vale destacar que, apesar de não haver diferença entre os grupos tratados com metformina, observa-se uma tendência de redução da resposta ao piruvato nos animais WT tratados com metformina, em comparação aos KO também tratados. Contudo, novamente não foi observada produção hepática de glicose em resposta ao piruvato após a PHx sugerindo que, mesmo após 7 dias de recuperação, o fígado dos animais submetidos à ressecção hepática, mesmo daqueles tratados com metformina, não se mostrou capaz de restabelecer completamente a função metabólica.

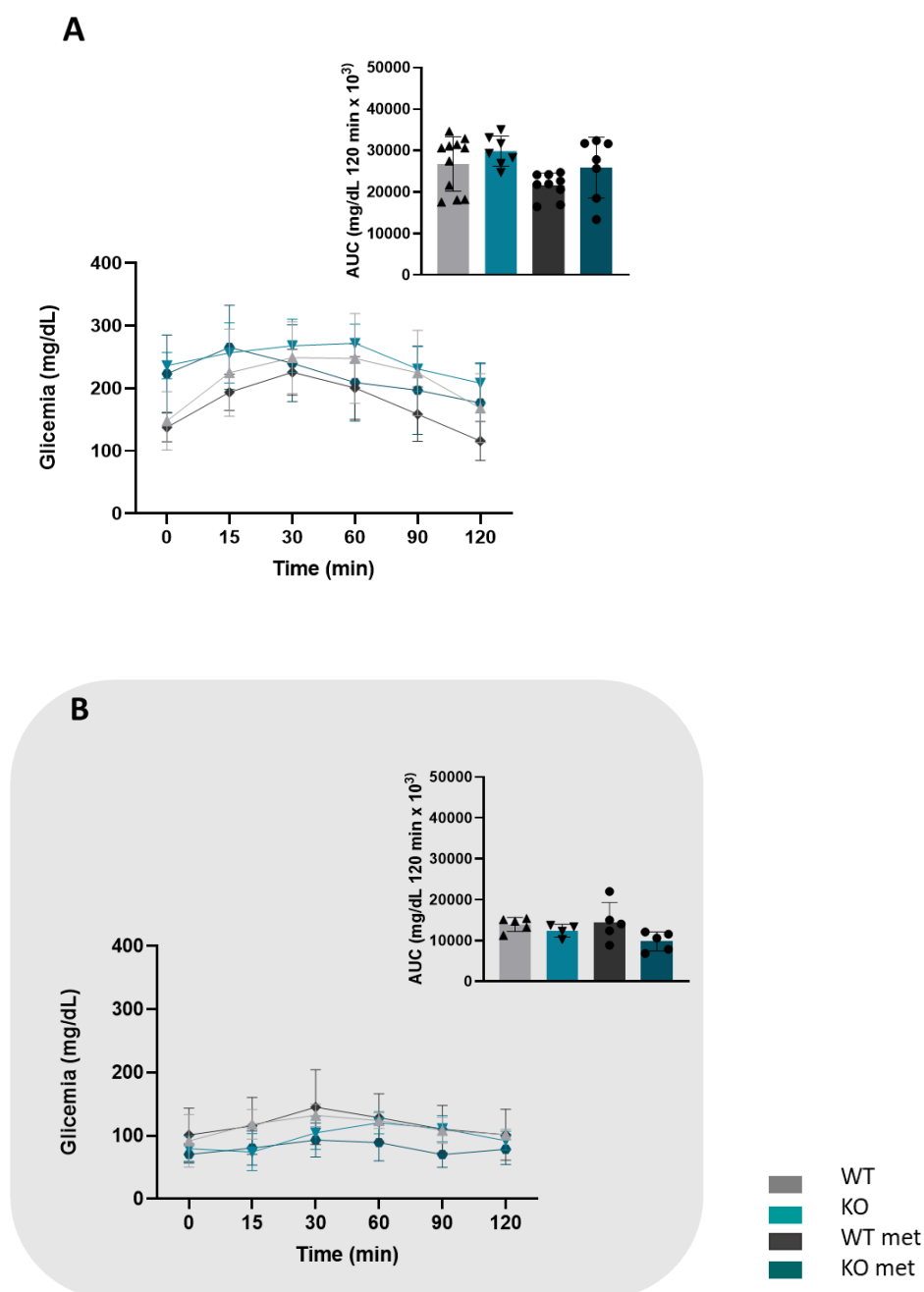


Figura 17: Avaliação da função hepática pelo teste de tolerância ao piruvato. (A) Avaliação da função hepática pela determinação do teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato (ipPTT) antes da PHx e área sob a curva (AUC). (B) Avaliação da função hepática pela determinação do teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato (ipPTT) depois da PHx e área sob a curva (AUC). Two-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni;

Para avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a função mitocondrial de camundongos com deleção do receptor $\alpha 7nAChR$ e a dependência da AMPK nesse processo, utilizamos o teste de Respirometria de alta resolução

(Oroboros). Como descrito nos métodos, avaliamos i) os níveis basais de consumo de oxigênio CI(M+G), ii) a respiração dependente do complexo I da cadeia respiratória, através da adição de ADP, iii) a respiração combinada do complexo I e do complexo II através da adição de succinato (CI + CII - Oxphos), iv) o acoplamento mitocondrial pela inibição do complexo I, através da adição de Rotenona, v) a inibição do complexo III, pela adição de Antimicina A e vi) a inibição do complexo V (ATP sintase) pela adição da Oligomicina. Também analisamos vii) a capacidade máxima do sistema de transferência de elétrons após a adição do desacoplador FCCP e, por fim, viii) avaliamos a capacidade de respiração mitocondrial que está associada à síntese de ATP (Complexo V), adquirida pelos valores de ADP/Oligomicina. A Fig. 18 A traz os resultados da função mitocondrial em camundongos machos antes da realização da PHx e a Fig. 18B traz os resultados após PHx. Pela análise estatística, não foi observada alteração da função mitocondrial e capacidade respiratória entre os grupos antes e após da realização da PHx (Fig. 18 A e B). No entanto, observa-se uma tendência à melhora da função respiratória nos animais WT tratados com metformina, mostrando que a ativação da AMPK provavelmente induz maior fluxo de elétrons para a cadeia respiratória e aumenta a produção de ATP, mesmo em animais sob dieta HFD (Fig. 18A). No entanto, tal efeito parece ser perdido após a hepatectomia, mostrando que a cirurgia impacta na função mitocondrial (Fig. 18B). Surpreendentemente, o tratamento com metformina parece reduzir a capacidade respiratória mitocondrial, uma vez que se observa uma tendência à menor produção de ATP após ativação da AMPK (Fig. 18A), mas sem diferença após PHx (Fig. 18B).

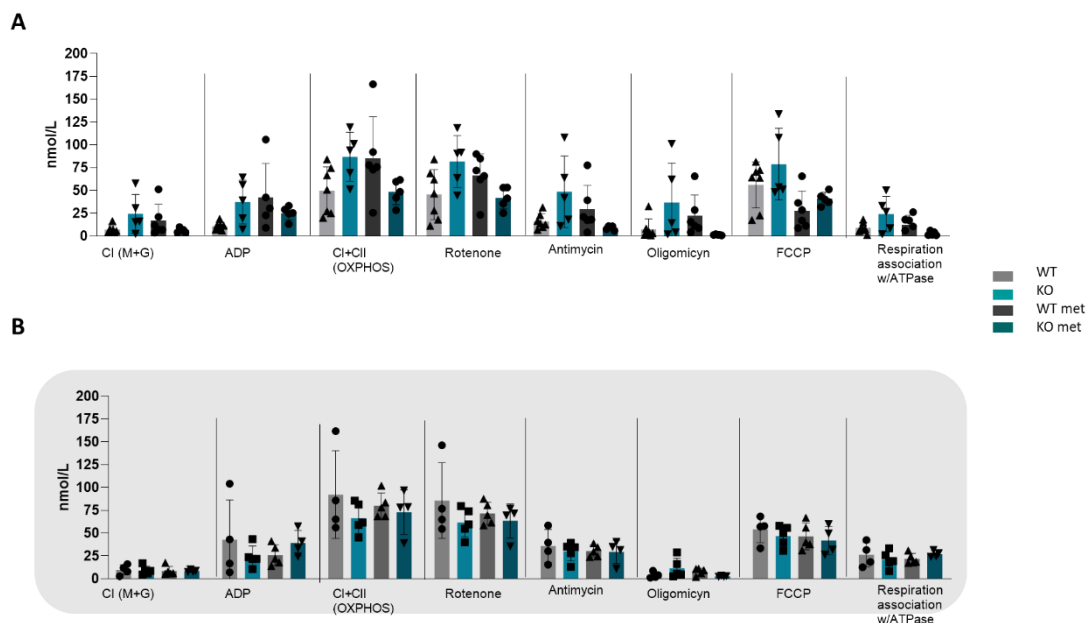


Figura 18: Análise do consumo de oxigênio e função mitocondrial em camundongos machos. (A) Análise do consumo de oxigênio e função mitocondrial em camundongos machos antes da PHx. (B) Análise do consumo de oxigênio e função mitocondrial em camundongos machos depois da PHx. One-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni.

4.3 Efeitos da dieta rica em gordura saturada (hiperlipídica), do tratamento com metformina e da hepatectomia parcial sobre a expressão gênica

Na análise de genes envolvidos com a resposta inflamatória (Fig 19), observamos maior expressão de interleucina 6 nos animais WT CT, comparados aos WT que receberam metformina, além de maior expressão de IL6 nos animais do grupo KO metformina, se comparado ao KO sem tratamento, antes da realização da PHx (Fig 19B). Também observamos aumento de interleucina 10 nos animais KO tratados com metformina, em comparação aos demais grupos (Fig 19C), bem como surpreendente aumento na expressão de mTOR nesse mesmo grupo (Fig 19A). Após a eutanásia, observamos aumento nos níveis de transcritos para mTOR em ambos os grupos tratados com metformina, em comparação com os demais grupos estudados. Não foi observada diferença entre os grupos estudados nos transcritos para genes inflamatórios, 7 dias após PHx (Fig 19E).

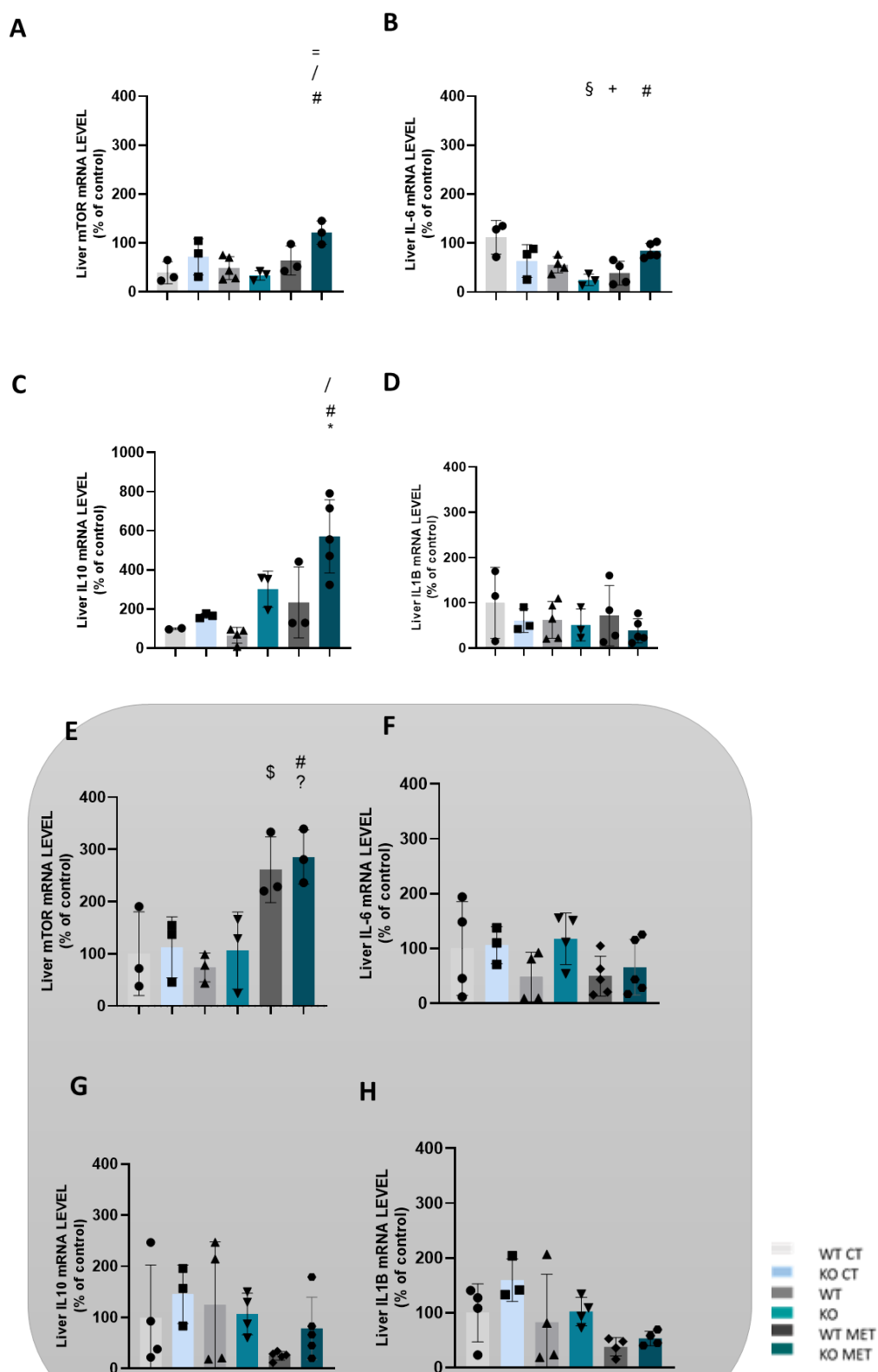


Figura 19: Avaliação da expressão gênica de IL6, IL10, IL1b e mTOR antes (A, B, C, D) e após PHx (E, F, G, H). One-way ANOVA com pos-hoc de Bonferroni, = CT WT x KO met, / WT x KO met, # KO x KO met, § CT WT x KO, + CT WT x WT met, \$ WT x WT met, ? CT KO x KO met, * WT met x KO met.

Na Fig. 20 está representada a expressão gênica do receptor $\alpha 7$ nAChR apenas em animais WT, antes (A) e após 7 dias da PHx (B), uma vez que em animais KO, como esperado, não foi detectada a presença de transcritos. Como pode ser observado, foi encontrada uma enorme variação na expressão do gene dentro de cada grupo. No entanto, considerando apenas o valor médio da expressão gênica, podemos supor que a dieta hiperlipídica, bem como o tratamento com metformina levam a uma redução da expressão do gene, o primeiro já visto em publicações anteriores do nosso grupo.

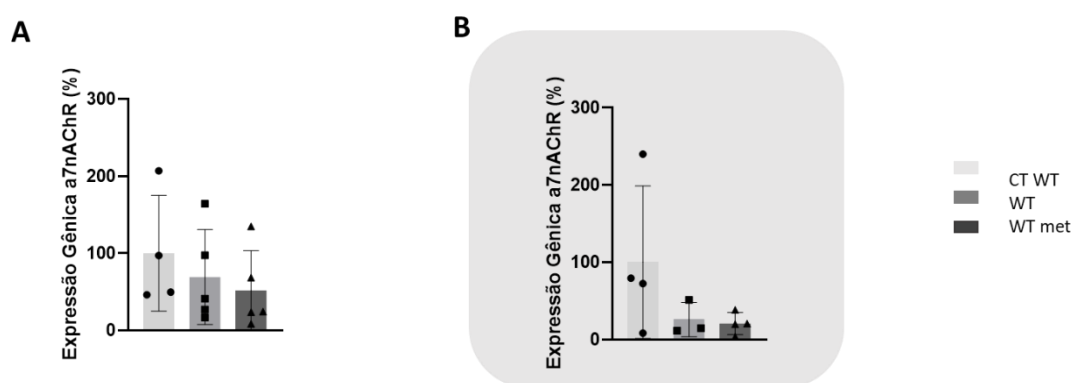


Figura 20: Avaliação da expressão gênica de $\alpha 7$ nAChR, antes (A) e 7 dias após PHx (B). One-way ANOVA com pos-hoc de bonferroni.

Avaliando a modulação da proteína AMPK no tecido hepático, bem como proteínas das vias de sinalização do receptor $\alpha 7$ nAChR, como JAK e STAT3, antes do procedimento de PHx, observamos que houve redução da fosforilação de AMPK nos animais tratados com metformina, bem como aparente redução de pAMPK nos animais KO sob HFD, comparados aos WT-HFD e KO-CT (Fig 21B e G), corroborando os achados de expressão gênica apresentados anteriormente. Além disso, também foi observada maior fosforilação de STAT3 no grupo KO tratado com metformina (Fig 21G), corroborando os achados de expressão gênica de IL6 apresentados anteriormente.

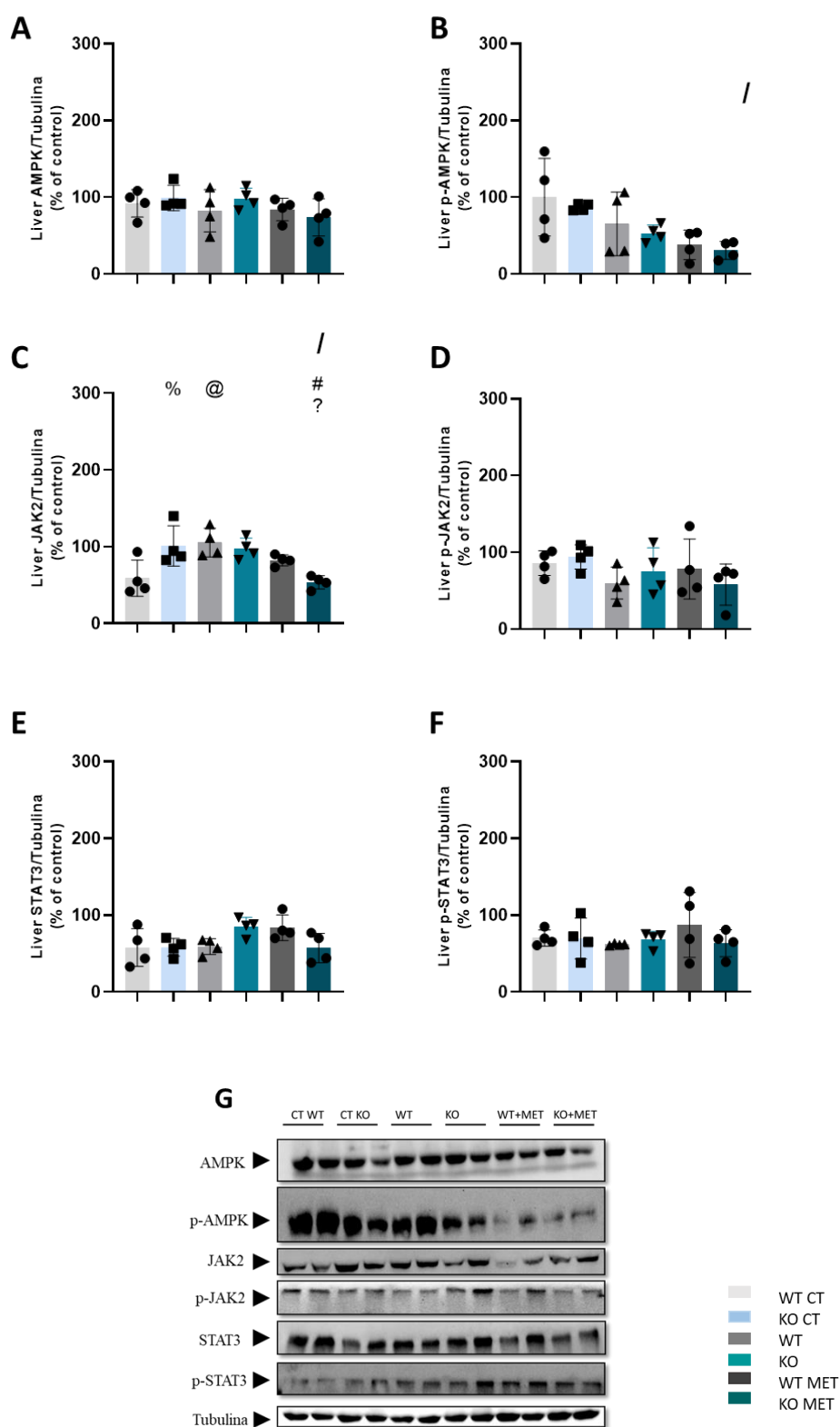


Figura 21: Imagem representativa (G) e quantificação (A, B, C, D, E, F) do conteúdo proteico de p-AMPK, AMPK, p-STAT3, STAT3, pJAK2, JAK2 antes da realização da PHx. One-way ANOVA com pos-hoc de bonferroni. @ WT CT x WT, % WT CT x KO CT, # KO x KO met, ? CT KO x KO met e / WT x KO met.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou investigar se a ativação da AMPK, dependente da sinalização colinérgica mediada por $\alpha 7$ nAChR, seria capaz de mitigar os efeitos do consumo de dieta rica em gordura saturada sobre a capacidade regenerativa do fígado após insulto mecânico. Nossos resultados mostram que o $\alpha 7$ nAChR parece controlar a regeneração hepática, uma vez que sua ausência melhorou a capacidade regenerativa do tecido, mesmo na presença de estímulo inflamatório. Animais KO para $\alpha 7$ nAChR apresentam melhor função mitocondrial e maior expressão de IL1b, apesar de maior TG hepático antes da cirurgia e perdem menos peso, apresentam menor lesão hepatocelular e melhor sobrevivência após PHx. Ainda, o tratamento com metformina parece ser importante coadjuvante no processo regenerativo, desde que em animais $\alpha 7$ nAChR-/- obesos, tratados com agonista de AMPK, a sobrevivência foi maior após PHx, concomitante com menor TG hepático, maior expressão de IL10 e maior sinalização das vias STAT3 e mTOR que podem contribuir para proliferação celular.

A obesidade é uma doença progressiva manifestada por um acúmulo excessivo de tecido adiposo, de característica multifatorial considerada uma doença crônica inflamatória subclínica, relaciona à diversas alterações metabólicas que podem levar ao desenvolvimento de outras doenças crônicas, como o diabetes mellitus tipo 2 e tem sido considerada um grande problema de saúde mundial (WANDERLEY e FERREIRA, 2010; BLÜHER, 2019; JASTREBOFF *et al.*, 2019). PESSENTHEINER; DUCASA; GORDTS, 2020; URANGA; KELLER, 2019).

A obesidade decorre principalmente do aumento no consumo de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares simples associados a redução do gasto energético, caracterizando-se como balanço energético positivo crônico (BRAY; BOUCHARD, 2020; FINUCANE *et al.*, 2011).

Além disso, diversos estudos têm demonstrado que o consumo de dieta hiperlipídica ativa vias inflamatórias, contribuindo para a instalação de comorbidades hepáticas associadas à obesidade, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (CHAVES, *et al.*, 2012; MORGANTINI, *et al.*, 2019; BENATTI, *et al.*, 2014; PAYOLLA, *et al.*, 2016). A DHGNA tem sido

estudada principalmente pela importante participação do fígado no metabolismo lipídico e na regulação do metabolismo dos carboidratos. (GRUBEN *et al.*, 2014; KARPE; DICKMANN; FRAYN, 2011; MATSUZAKA; SHIMANO, 2011; SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007)

A DHGNA é uma doença característica de obesidade e diabetes e está intimamente associada à sinais inflamatórios (BENATTI, 2014). Em casos mais graves, a única possibilidade é a ressecção de parte do tecido hepático comprometido, através da hepatectomia parcial (PHx), sendo que a sobrevivência do indivíduo depende de sua capacidade de regeneração hepática (RH). Estudos revelam que o fígado de indivíduos obesos apresenta menor capacidade de regeneração, uma vez que o acúmulo de gordura causa um quadro de inflamação permanente. Adicionalmente, o grau de esteatose parece influenciar na capacidade regenerativa (FANTE *et al.*, 2021).

Assim, apesar de muitos autores já descrevem os efeitos do consumo de dieta rica em gordura saturada, poucos estudos descrevem o papel do receptor $\alpha 7$ nAChR aliado ao consumo dessa dieta (COSTA, *et al.*, 2020; SOUZA, *et al.*, 2019).

Um dos papéis do receptor $\alpha 7$ nAChR é sua ação anti-inflamatória e modulatória imune, reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias e, consequentemente, a inflamação hepática (REN, *et al.*, 2017; MCFADDEN; CORNIER; TREGELLAS, 2014). Outro papel descrito do receptor $\alpha 7$ nAChR é que este modula centralmente a atividade dos neurônios hipotalâmicos envolvidos na regulação da ingestão de alimentos, incluindo a POMC e o neuropeptídeo Y (MCFADDEN; CORNIER; TREGELLAS, 2014). Esses papéis poderiam contribuir tanto no quadro de inflamação sistêmica e hepática quanto no balanço energético positivo crônico desencadeado pelo consumo de dieta hiperlipídica.

Complementarmente, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), é considerada um regulador central da homeostase energética que também responde pelo metabolismo lipídico no fígado atuando na inibição da expressão de genes lipogênicos, como Acc e Fas, através da modulação do fator de transcrição SREBP1c. Por conseguinte, a AMPK pode desempenhar papel fundamental no controle da deposição de gordura hepática e no desenvolvimento de DHGNA.

Pesquisas utilizam a dieta hiperlipídica (HFD) para induzir obesidade severa e provocar alterações metabólicas de forma mais precoces, porém foi demonstrado que 45% de gordura na dieta é suficiente para levar a alterações metabólicas que resultem em ganho de peso e de adiposidade (SPEAKMAN, 2019). De fato, observamos no presente estudo que a HFD foi capaz de aumentar o ganho de peso dos animais em quatro semanas em relação aos animais que receberam dieta padrão, especialmente nos animais WT.

Apesar de não termos analisado o consumo alimentar, é importante destacar que dietas hiperlipídicas palatáveis promovem hiperfagia decorrente da alteração na regulação central que afeta o padrão de comportamento, incluindo neurotransmissores e hormônios específicos (CARLIN *et al.*, 2016; FORDHAL; LOCKE; JONES, 2016). Essa hiperfagia pode ser responsável pelo aumento abrupto de ganho peso observado a partir da segunda semana de introdução de dieta.

O desenvolvimento de inflamação e DHGNA já está bem caracterizado na literatura. Um estudo recente conduzido por nosso grupo mostrou que o consumo de dieta hiperlipídica leva à um aumento na expressão de Let-7, microRNA que tem como alvo o RNAm da AMPK (SIMINO *et al.*, 2021). A AMPK apresenta importante papel na inibição de vias anabólicas e ativação de vias catabólicas, contribuindo para a elevação da atividade mitocondrial e diminuição da via da gliconeogênese (JUSKEVICIUTE, *et al.*, 2019). Além disso a ativação da AMPK também pode suprimir o estresse oxidativo e inibir a apoptose em vários sistemas celulares (HASAN, *et al.*, 2018). Diversos estudos, mostram a relação da AMPK na regulação do metabolismo lipídico, glicídico e no controle da fome. Outro estudo demonstrou que a AMPK é necessária para a fragmentação de mitocôndrias induzida por rotenona e antimicina A, respectivamente, inibidores do complexo I e complexo III da cadeia respiratória mitocondrial (HERZIG e SHAW, 2018).

Além disso, tem sido reportado que a dieta rica em lipídeos, quando comparada a dieta padrão, apresenta alto nível de eficiência energética o que por sua vez reprime a capacidade oxidativa mitocondrial no fígado e no músculo esquelético levando o corpo a manter a homeostase, reduzindo o consumo alimentar (DÍAZ-URBINA *et al.*, 2018; GAO; MA; LIU, 2015). No presente estudo, não observamos os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a função mitocondrial, o

que sugere que a DH ainda não alterou essa variável como postulado. É importante ressaltar que o aumento da ingestão energética ainda intensifica os sinais de saciedade reduzindo progressivamente a ingestão alimentar como forma de prevenir o acentuado ganho de peso (DÍAZ-URBINA *et al.*, 2018).

Por conseguinte, sabe-se que o fígado além de participar do metabolismo lipídico, também regula o metabolismo da glicose. Dessa forma, inúmeros estudos investigaram a associação entre dieta hiperlipídica e resistência à insulina (RI), sendo demonstrado que em indivíduos obesos, existe comumente a presença da RI, porém se essa alteração existe como causa ou consequência da obesidade, ainda não está bem definido (GRUBEN *et al.*, 2014; KARPE; DICKMANN; FRAYN, 2011; MATSUZAKA; SHIMANO, 2011; SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007).

O que está claro é que os AGL ativam receptores *toll-like* (TLR) que, por sua vez, ativam o complexo de proteína quinase Ikk- β (inibidor da subunidade beta do fator nuclear kappa- β) e inibem a ação do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1), interferindo diretamente na sinalização insulínica, contribuindo para RI (GRUBEN *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2006).

Além disso, a inflamação gerada pela deposição ectópica de lipídeos contribui para o aumento da expressão das citocinas inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e que também estão envolvidas com a Resistência Insulínica (SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007).

Por outro lado, a manifestação inicial da RI pode levar a esteatose hepática por estimular a lipogênese, promovendo o aumento de TG e AGL intra-hepáticos e, posteriormente, na circulação sanguínea, causando consequente reabsorção pelo tecido adiposo e fígado, gerando um ciclo vicioso (GRUBEN *et al.*, 2014; MATSUZAKA; SHIMANO, 2011).

Todavia, no presente estudo a exposição à dieta hiperlipídica não promoveu alterações significativas no peso relativo dos tecidos adiposos brancos (retroperitoneal e epididimal) e no tecido hepático. Também não foi observado alterações significativas na glicemia e produção de glicose. Isso pode estar relacionado ao tempo de exposição à dieta hiperlipídica, a espécie de camundongo utilizado, o tipo de gordura e o percentual utilizado.

No que se refere a hepatectomia parcial (PHx), este é um modelo clássico e bem caracterizado de regeneração hepática em camundongos (MITCHELL & WILLENBRING, 2008). A PHx produz uma resposta inflamatória intensa, porém controlada, caracterizada por duas fases distintas (Fase de Iniciação e de Proliferação) que levam à regeneração do tecido. Fatalmente, a ressecção induz lesão hepatocelular e extravasamento de enzimas hepáticas, as quais funcionam, inclusive, como marcadores do processo de regeneração, o que corrobora os achados de ALT/AST em nosso modelo experimental, devidos aos danos causados pela PHx (USPENSKA, *et al.*, 2018).

Acreditamos que os animais do tipo selvagem (WT), que receberam dieta hiperlipídica, deveriam apresentar uma redução na expressão de $\alpha 7$ nAChR no fígado, como demonstrado em trabalhos anteriores de nosso grupo (PAYOLLA *et al.*, 2016). Nossa hipótese era que a redução da expressão desse receptor poderia explicar uma menor capacidade regenerativa deste órgão, bem como uma baixa taxa de sobrevivência. No entanto, ainda não se sabe por quais mecanismos a redução na expressão de $\alpha 7$ nAChR modula a capacidade do fígado de se regenerar, e se essa capacidade regenerativa estaria relacionada às alterações no controle da homeostase energética mediada por AMPK. No entanto, no presente estudo, nossa hipótese não foi confirmada, uma vez que animais KO para $\alpha 7$ nAChR apresentaram melhor sobrevida após PHx, decorrente de melhor capacidade regenerativa hepática.

Por sua vez, experimentos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que camundongos adultos *knockout* para o receptor $\alpha 7$ nAChR, alimentados com ração comercial, mantiveram a capacidade de regenerar o fígado após insulto mecânico. Por outro lado, quando esses animais foram alimentados com dieta hiperlipídica por cerca de um mês e, posteriormente submetidos à ressecção hepática, observou-se um menor índice de regeneração deste órgão (dados não publicados). No presente estudo, independente da dieta, a sobrevivência dos animais *knockout* $\alpha 7$ nAChR foi maior comparada aos animais WT.

A literatura recente tem apontado a modulação da autofagia, um importante processo de degradação lisossomal, como um possível mecanismo associado ao desenvolvimento de complicações metabólicas relacionadas à obesidade. Em indivíduos adultos, a obesidade e a sobrecarga lipídica

representam fatores que comprometem a autofagia e, uma vez que a autofagia está relacionada com a degradação de gotas de lipídeos em hepatócitos (SING, *et al.*, 2009), seu envolvimento no desenvolvimento de DHGNA tem sido cada vez mais estudado.

É importante destacar que autofagia é um mecanismo essencial de reciclagem de componentes celulares, que desempenha um papel crucial na manutenção do metabolismo hepático e também na promoção da regeneração hepática. A autofagia fornece glicose, aminoácidos e ácidos graxos livres aos hepatócitos para manter sua função metabólica basal (CHUN & KIM, 2018).

Neste sentido, a regeneração do fígado requer energia abundante e substâncias celulares para a replicação do DNA e divisão celular. Assim, a autofagia pode efetivamente fornecer as substâncias necessárias durante o período regenerativo e remover organelas disfuncionais ou proteínas agregadas. Ambos contribuem para a proliferação coordenada de hepatócitos durante o processo regenerativo (XU *et al.*, 2020).

De acordo com Xu *et al.*, (2020) experimentos recentes mostraram que existe uma ligação estreita entre autofagia e regeneração hepática, mas seu papel é discutido de forma controversa. A maioria dos estudos mostrou que uma indução moderada de autofagia pode promover a regeneração do fígado, mas alguns estudos chegaram à conclusão oposta. O que tem sido postulado é que a autofagia é regulada por via de transdução de sinal dependente de rapamicina (mTOR) e independente de mTOR em mamíferos (SPEIRS *et al.*, 2018).

Complementarmente, a via do transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT) Janus quinase (JAK) medeia a sinalização por uma gama de citocinas, dentre elas a IL-6, que podem estimular ou inibir as respostas de sobrevivência, proliferação e diferenciação em diversos tipos de células (SPEIRS *et al.*, 2018; RUTHERFORD *et al.*, 2016).

O mecanismo pelo qual AMPK pode inibir potencialmente a sinalização de JAK-STAT é através da supressão bem caracterizada da via de destino da rapamicina em mamíferos (mTOR) por meio de fosforilação direta e inibição de Raptor e ativação do complexo de esclerose tuberosa de proteína ativadora de Rheb GTPase 2 (TSC2). No entanto, apesar de relatos demonstrando que a inibição da sinalização mTOR suprime a ativação de JAK-STAT, os mecanismos moleculares responsáveis por esse fenômeno permanecem desconhecidos.

Além disso, um dos aspectos da função AMPK mais estudado é seu papel em manter os estoques de energia celular e regular o equilíbrio energético de todo o corpo (SPEIRS *et al.*, 2018; RUTHERFORD *et al.*, 2016).

No presente estudo, observamos apenas uma tendência de alterações na expressão da AMPK hepática e de mtTOR nos grupos experimentais, por outro lado, houve uma maior expressão da JAK2 nos animais knockout para o receptor $\alpha 7$ e nos animais wild type alimentados com dieta hiperlipídica. Tais resultados não parecem estar relacionados com a taxa de sobrevivência, mas com adaptações metabólicas específicas da inativação do receptor colinérgico $\alpha 7$ nAChR e da dieta hiperlipídica.

Em relação a massa corporal, os animais KO $\alpha 7$ nAChR alimentados com dieta padrão apresentaram menor massa do que os animais WT, porém o ganho de peso foi significativamente maior comparado aos animais selvagens. Esse comportamento manteve-se mesmo após a PHx. Nestes casos, a ausência do sinal colinérgico do receptor $\alpha 7$ nAChR sobre a ingestão alimentar pode ser a responsável pelo ganho de peso significativo desses animais, mesmo consumindo uma dieta normocalórica. De maneira semelhante ao observado nos animais WT (CT e HFD), não houve alterações significativas no TG hepático, glicemia e produção de glicose (pré e pós-PHX), metabolismo mitocondrial hepático (pré e pós-PHX), dos animais KO $\alpha 7$ nAChR. No entanto, ao mesmo aparentemente, os animais KO expostos à dieta hiperlipídica parecem mais protegidos da lesão hepática, uma vez que apresentam menor nível de transaminases séricas e tendência de menor TG pós-cirurgia.

Li e colaboradores observaram que a deleção genética de $\alpha 7$ nAChR em camundongos agravou significativamente o desenvolvimento de DHGNA induzida por HFD, indicando um papel protetor de $\alpha 7$ nAChR nos camundongos que apresentavam a doença, na medida em que este receptor parece contribuir para a melhora na homeostase energética, além de inibir a inflamação na doença hepática gordurosa não alcoólica (LI *et al.*, 2018) Apesar disso, não foi observado alterações nos marcadores inflamatórios dos dois grupos *knockout* (expostos à dieta CT e HFD) para o receptor $\alpha 7$ nAChR.

Adicionalmente, no presente estudo foi possível observar que o tratamento com metformina, ativador farmacológico de AMPK, na vigência da dieta hiperlipídica, levou a uma menor mortalidade após PHx, sugerindo que a

esperada ativação da AMPK foi fundamental para garantir a sobrevivência de animais que passaram por ressecção, independente da dieta. No entanto, tal ativação não foi confirmada nas análises moleculares de AMPK realizadas.

Surpreendentemente, a fosforilação de AMPK não foi maior nos grupos sob tratamento com metformina, resultado que corrobora a maior expressão de mTOR analisada após a hepatectomia, uma vez que AMPK suprime mTorc1, assim como a menor expressão de JAK2 observada nos animais knockout para o receptor $\alpha 7$ nAChR.

É interessante destacar que, antes da PHx, somente os animais KO $\alpha 7$ nAChR tratados com metformina apresentaram maior expressão hepática de mTOR em relação aos animais sem tratamento, independente da dieta e da presença do $\alpha 7$, o que pode estar relacionado ao fato desses animais terem apresentado uma maior expressão de IL-6 hepática em relação aos animais KO sem tratamento, uma vez que ela é uma citocina pleiotrópica e um forte ativador de mTOR (SPEIRS et al., 2018; RUTHERFORD et al., 2016; TAO et al., 2017; FITZGERALD et al., 1995; MULLHAUPT et al., 1994).

Esses resultados sugerem que, mesmo sem a ativação da AMPK, o processo de autofagia deve ocorrer, e que o stress fisiológico provocado pela PHx deva ser o responsável pelo estímulo desse processo, contribuindo para a sobrevivência dos animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com metformina. No entanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar a essa hipótese.

Em relação ao ganho de peso, o tratamento com metformina não foi capaz de controlar os efeitos da alta ingestão calórica decorrente da dieta hiperlipídica tanto nos animais WT quanto nos KO. Notadamente, o maior ganho de peso foi dos animais *knockout* para o receptor $\alpha 7$ nAChR e que manteve o comportamento após a PHx. Esses animais também apresentaram uma maior expressão proteica da IL10.

Estudos demonstraram que a capacidade respiratória mitocondrial do fígado diminuiu em camundongos obesos e que a quantidade de mitocôndrias isoladas por grama de fígado de camundongos obesos era menor do que a de camundongos magros (HOLMSTROM et al., 2012; BUCHNER et al., 2011). Por outro lado, um estudo mostrou indução de OXPHOS em mitocôndrias isoladas do fígado de animais com altas taxas glicêmicas, sendo característica de

sobrecarga de combustível no fígado. Além disso, o aumento da concentração de ácidos graxos livres na obesidade e diabetes fornecem outro tipo de excesso de combustível para o fígado (ALIMUJIANG, *et al.*, 2020), o que pode explicar o aumento da função OXPHOS mitocondrial em camundongos obesos.

No entanto, outros autores relataram que a HFD afetou apenas a respiração das mitocôndrias musculares, e que não houve alteração quando substratos como piruvato / glutamato mais malato e succinato foram usados (HOEKS, *et al.*, 2008; CHANSEAUME, *et al.*, 2007). Apesar disso, não observamos melhora na função metabólica hepática de animais KO tratados com metformina, uma vez que tanto a produção hepática de glicose, quanto a capacidade respiratória não foram diferentes entre os grupos.

Já é descrito que a gliconeogênese hepática é uma via de consumo de ATP que aumenta dramaticamente no diabetes, sugerindo que em distúrbios metabólicos, a glicose e os ácidos graxos entram no fígado para aumentar a ativação da OXPHOS mitocondrial, gerando energia para a manutenção da gliconeogênese (ALIMUJIANG, *et al.*, 2020). Animais machos obesos, sem tratamento com metformina, apresentaram aumento da produção hepática de glicose estimulada por piruvato, independente do genótipo. No entanto, a administração de metformina levou a uma redução na gliconeogênese, independente do genótipo nesses animais, corroborando os dados da literatura. Nesse sentido, a ausência do receptor não pareceu afetar distintamente a capacidade metabólica hepática, até porque, como comentado anteriormente, acreditamos que os animais WT expostos à HFD também apresentam redução da expressão do receptor $\alpha 7$ nAChR, que ainda precisa ser confirmada.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica agrava a sobrevivência dos indivíduos após PHx. Além disso, a falta do receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) aumenta a resposta inflamatória, porém a administração de metformina parece ser fundamental para garantir a sobrevivência em animais obesos que passaram por ressecção. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nessa modulação por AMPK ainda precisam ser melhor elucidados.

REFERÊNCIAS

1. ALIMUJIANG, M. *et al.* Enhanced liver but not muscle OXPHOS in diabetes and reduced glucose output by complex I inhibition. **J Cell Mol Med**, v. 24, p.5758–5771, 2020.
2. AMINI, N. *et al.* Liver regeneration after major liver hepatectomy: impact of body mass index. **Surgery**, v.160, n. 1, p. 81-91, 2016.
3. ARAI, M. *et al.* Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiology of mouse liver regeneration. **Journal of Biological Chemistry**. v.278, n.32, p.29813-8, 2003
4. BARROS, L.S.A; NUNES, C.C. A influência do exercício físico na captação de glicose independente de insulina. **Rev. Hu**, n. 45, v.1, p:59-64, 2019.
5. BATISTA, V.S. Estudos de modelagem molecular de compostos bioativos frente ao receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo alfa4beta2. 2016. 124 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Química) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Química, 2016.
6. BELLENTANI, S. *et al.* Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Digestive Diseases**, v.28, n.1, p.155-61, 2010
7. BENATTI, R.O. *et al.* O consumo materno de dieta rica em gordura modula o metabolismo lipídico hepático e o microRNA-122 (miR-122) e microRNA-370 (miR-370) expressão na prole. **British Journal of Nutrition**, v.111, p. 2112-2122, 2014
8. BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019.
9. BRASIL. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
10. BRAY, G. A.; BOUCHARD, C. The biology of human overfeeding: A systematic review. **Obesity Reviews**, v. 21, n. 9, p. 1–78, 2020.
11. BUCHNER, D A. *et al.* Increased mitochondrial oxidative phosphorylation in the liver is associated with obesity and insulin resistance. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, p.917-924, 2011.
12. CARLIN, J. *et al.* Removal of high fat diet after chronic exposure drives binge behavior and dopaminergic dysregulation in female mice. **Neuroscience**, v. 326, p. 170–179, 2016.

13. CARVALHEIRA, J.B.C; ZECCHIN, H.G. e SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.46, n.4, p.419-425, 2002.
14. CASTRO, A.C.G; BIZZI, M.F; JUNIOR, A.R.O. Amp- Proteína Quinase Ativada (AMPK): O Elo Proteico entre Metabolismo e Câncer. **Rev Med Minas Gerais**, n.30, 2020.
15. CHANSEAUME, E. *et al.* Chronological approach of diet-induced alterations in muscle mitochondrial functions in rats. **Obesity (Silver Spring)**, v.15, p.50-59, 2007.
16. CHAVES, G. V. *et al.* Associação entre doença hepática gordurosa não alcoólica e marcadores de lesão/função hepática com componentes da síndrome metabólica em indivíduos obesos classe III. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 288-293, 2012.
17. CHUN, Y.; KIM, J. Autophagy: an essential degradation program for cellular homeostasis and life. **Cells**, v. 7, n. 12, p. 278, 2018.
18. CINTRA, F.F. Influência da nutrição na expressão de genes relacionados à obesidade. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 24, n. 2, p. 81-85, 2020.
19. DÍAZ-URBINA, D. *et al.* Effects of a high-fat diet on behavioral eating patterns. **Acta Colombiana de Psicología**, v. 21, n. 1, p. 95-115, 2018.
20. FANTE, T. *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, 2016
21. FAUSTO, N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. **Liver Transpl**, v. 7, n. 10, p. 835-844, 2001
22. FINUCANE, M. M. *et al.* National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9• 1 million participants. **The lancet**, v. 377, n. 9765, p. 557-567, 2011.
23. FITZGERALD, M.J. *et al.* N. Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. **Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**. v.6, n.4, p.417-27, 1995.
24. FORDAHL, S. C.; LOCKE, J. L.; JONES, S. R. High fat diet augments amphetamine sensitization in mice: Role of feeding pattern, obesity, and dopamine terminal changes. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 170-182, 2016.
25. GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.
26. GRUBEN, N. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: A main driver of insulin resistance or a dangerous liaison? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1842, n. 11, p. 2329–2343, 2014.

27. HASAN, M.K. *et al.* $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist Ameliorates Nicotine Plus High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis in Male Mice by Inhibiting Oxidative Stress and Stimulating AMPK Signaling. **Endocrinology**, v.159, n.2, p.931–944, 2018.
28. HERZIG, S.; SHAW R.J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY**, v.19, 2018.
29. HOEKS, J. *et al.* Mitochondrial function, content and ROS production in rat skeletal muscle: effect of high-fat feeding. **FEBS Lett**, v.582, p.510–516, 2008
30. HOLMSTROM, M. H. *et al.* Tissue-specific control of mitochondrial respiration in obesity-related insulin resistance and diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.302, p.E731-E739, 2012.
31. HOTAMISLIGIL G, S. Inflammatory pathways and insulin action. **Int J Obes Relat Metab Disord**. 2003
32. JASTREBOFF, A. M. *et al.* Obesity as a Disease: The Obesity Society 2018 Position Statement. **Obesity**, v. 27, n. 1, p. 7–9, 2019.
33. JEBB, S.A. Aetiology of obesity. **British Medical Bulletin**, London, v.53, n.2, p.264-285, 1997
34. JING, Y. *et al.* Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization. **Mol. Cell. Endocrinol**, v.461, 2018.
35. JOHNSTON, G.R.; WEBSTER, N.R. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. **Br J Anaesth**, v.102, n.4, p.453-62, 2009.
36. JUSKERICIUTE, E. *et al.* CAMKK2-dependent AMPK activation is required to drive cell cycle progression and hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in the rat. **FASEB journal**, v.33, 2019.
37. KAMIMURA, K. *et al.* Autonomic nervous system network and liver regeneration. **World journal of gastroenterology**, v.24, n.15, p. 1616, 2018.
38. KARPE, F.; DICKMANN, J. R.; FRAYN, K. N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: Time for a reevaluation. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2441–2449, 2011.
39. LEITE, L.D; ROCHA, E.D.M; NETO, J.B. Obesity: an inflammatory disease. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2009
40. LI, Dong-Jie *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit improves energy homeostasis and inhibits inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism**, v. 79, p. 52-63, 2018.
41. LYONS, C.L.; ROCHE, H.M. Nutritional Modulation of AMPK-Impact upon Metabolic-Inflammation. **Int. J. Mol. Sci**, v.19, n.10, 2018.
42. MAGDALON, J.; FESTUCCIA, W.T. Regulation of adiposity by mTORC1. **Einstein**, v. 15, n.4, p.507-11, 2017.

43. MATSUZAKA, T.; SHIMANO, H. Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 2, n. 3, p. 170–175, 2011.
44. MCFADDEN, Kristina L.; CORNIER, Marc-Andre; TREGELLAS, Jason R. The role of alpha-7 nicotinic receptors in food intake behaviors. **Frontiers in Psychology**, v. 5, p. 553, 2014.
45. MEMOLI, B. *et al.* Inflammation may modulate IL-6 and C-reactive protein gene expression in the adipose tissue: the role of IL-6 cell membrane receptor. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 293, n.4, p.1030-5, 2007.
46. MICHALOPOULOS, G.K; BHUSHAN, B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. **Nature Reviews, Gastroenterology & Hepatology**, v.18, 2021.
47. MITCHELL, Claudia; WILLENBRING, Holger. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1167-1170, 2008.
48. MORGANTINI, C. *et al.* Liver macrophages regulate systemic metabolism through non-inflammatory factors. **Nature Metabolism**, v.1, p.445–459, 2019.
49. MULLHAUPT, B. *et al.* Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increases in immediate-early phase of liver regeneration. **Journal of Biological Chemistry**. v.269, n.31, p.19667-70, 1994.
50. NETO, E.M.R. *et al.* Metformina: uma revisão da literatura. **Saúde e Pesquisa**, v.8, n.2, p.355-362, 2015.
51. PAYOLLA, T.B. *et al.* dieta rica em gordura durante a gravidez e a lactação prejudica a via antiinflamatória colinérgica no fígado e no tecido adiposo branco da prole de camundongos, **Endocrinologia molecular e celular**, 2016
52. PESSENTHEINER, A. R.; DUCASA, G. M.; GORDTS, P. L. S. M. Proteoglycans in Obesity-Associated Metabolic Dysfunction and Meta-Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. May, p. 1–18, 2020.
53. PORTELA, C.L.M. *et al.* Aspectos fisiopatológicos e nutricionais da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). **Rev Bras Nutr Clin**, v.28, n. 1, p. 54-60, 2013.
54. RANADIVE, S.A; VAISSE C. Lições da obesidade humana extrema: distúrbios monogênicos. **Endocrinol Metab Clin N Am**, n.38, p.733-751, 2008.
55. REN, C. *et al.* The Protective Effect of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation on Critical Illness and Its Mechanism. **Int J Biol Sci**, v.13, n.1, p.46-56, 2017.
56. RENA, G. *et al.* Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? **Diabetologia**, v.56 p.1898–1906, 2013.
57. RUAN, H.; LODISH, H.F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . **Cytokine Growth Factor Rev**. 14:447-455, 2003.

58. RUTHERFORD, C. et al. Phosphorylation of Janus kinase 1 (JAK1) by AMP-activated protein kinase (AMPK) links energy sensing to anti-inflammatory signaling. **Science signaling**, v. 9, n. 453, p. ra109-ra109, 2016.
59. SALAMÃO, L.S. et al. Avaliação da regeneração hepática com modulação pelo pré-condicionamento isquêmico após isquemia e reperfusão e hepatectomia parcial. **Rev. Col. Bras. Cir**, v.39, n.3, 2012.
60. SANTOMAURO. et al. Metformina e AMPK: Um Antigo Fármaco e Uma Nova Enzima no Contexto da Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.52, n.1, 2008.
61. SANTOS, M.S.T. et al. The influence of obesity in the non-alcoholic fatty liver disease. **Brazilian Journal of Health Review**, v.4, n.2, p. 5021-5033, 2021
62. SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169–2180, 2007.
63. SIMINO, L.A.P. MicroRNA Let-7 targets AMPK and impairs hepatic lipid metabolism in offspring of maternal obese pregnancies. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-8, 2021.
64. SINGH, R. et al. Autophagy regulates lipid metabolism. **Nature**, v.458, 2009.
65. SINHA-HIKIM, A.P.; SINHA-HIKIM, I.; FRIEDMAN, T.C. através da inibição dos proteína-1c de ligação ao elemento primário (SREBP1-c). **Front. Endocrinol**. v. 8, 2017.
66. SONG, M. J. et al. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, n. 3, p. 739–745, 2006.
67. SOUZA, Anelise Cristina Parras et al. Short-term high-fat diet consumption reduces hypothalamic expression of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit ($\alpha 7$ nAChR) and affects the anti-inflammatory response in a mouse model of sepsis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 565, 2019.
68. SOUZA, Camilla Mendes et al. JAK2/STAT3 pathway is required for $\alpha 7$ nAChR-dependent expression of POMC and AGRP neuropeptides in male mice. **Cellular physiology and biochemistry**, v.53, p.701-712, 2019.
69. SPEAKMAN, J. R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. **International Journal of Obesity**, v. 43, n. 8, p. 1491–1492, 2019.
70. SPEIRS, Claire et al. Linking energy sensing to suppression of JAK-STAT signalling: a potential route for repurposing AMPK activators?. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 88-100, 2018
71. TAN, C.Y.; VIDAL, P.A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. **Portland Press Limited**; 2008.

72. TAN, X. *et al.* Nerve fibers in the tumor microenvironment in neurotropic câncer- pancreatic câncer and ccholangiocarcinoma. **Oncogene**, v.40, n.5, 2020.
73. TAO, Y. *et al.* Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. **Mediators of Inflammation**. 2017
74. TRAUNER, M. *et al.* Fatty liver and lipotoxicity. **Biochim Biophys Acta**, v.1801, n.3, p.299-310, 2010.
75. TRAYHURN, P.; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br J Nutr**. v.92, n.3, p.347-55, 2004.
76. TRUANT, S. *et al.* Volumetric gain of the liver after major hepatectomy in obese patients: a case-matched study in 84 patients. **Annals of surgery**, v.258, n.5, p.696-704, 2013.
77. URANGA, R. M.; KELLER, J. N. The complex interactions between obesity, metabolism and the brain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. MAY, p. 1–21, 2019.
78. USPENSKA, Kateryna *et al.* Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors support liver cells viability after partial hepatectomy. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 626, 2018.
79. VEDANA, E.H.B. *et al.* Prevalência de Obesidade e Fatores Potencialmente Causais em Adultos em Região do Sul do Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.57, n.7, 2008.
80. VENTURA, A.L.M, *et al.* Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Rev Psiq Clín**, v.37, n.2, p.66-72, 2010.
81. WANDERLEY, E.N; FERREIRA, V.A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p.185-194, 2010.
82. WANG, D.W.; ZHOU, R.B.; YAO, Y.M. Role of cholinergic anti-inflammatory pathway in regulating host response and its interventional strategy for inflammatory diseases. **Chin J Traumatol**, v.12, n.6, p. 355-64, 2009.
83. WHO, World Health Organization. Fact sheet: **Obesity and overweight**. 2020
84. XU, F. *et al.* The role of autophagy for the regeneration of the aging liver. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 10, p. 3606, 2020.
85. YU, K. *et al.* Association between MC4R rs17782313 genotype and obesity: A meta-analysis. **Gene**, v. 733, 2020.
86. ZANG, M. *et al.* AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. **J Biol Chem**, v. 279, 2004.
87. ZHOU, Z. *et al.* Treatment of experimental non-alcoholic steatohepatitis by targeting $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated inflammatory responses in mice. **Molecular medicine reports**, v.12, p.6925-6931, 2015.

ANEXO

CERTIFICADO CEUA nº 19/2021



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **A PARTICIPAÇÃO DA SINALIZAÇÃO COLINÉRGICA NA ATIVAÇÃO DA AMPK E SEUS EFEITOS SOBRE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS OBESOS.**, registrada com o nº 5686-1/2020, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Adriana Souza Torsoni e Leticia Celotti**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 17/12/2020.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	23/12/2020 a 31/03/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	17/12/2020 a 31/03/2022
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo isogênico / C57BL6
No. de animais:	20
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo isogênico / C57BL6
No. de animais:	20
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo isogênico / C57BL6
No. de animais:	20
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo isogênico / C57BL6
No. de animais:	20
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo isogênico / C57BL6
No. de animais:	20
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo Knockout / KO $\alpha 7nAChR$
No. de animais:	20
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo Knockout / KO $\alpha 7nAChR$
No. de animais:	20
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 35.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem / raça:	Camundongo Knockout / KO $\alpha 7nAChR$

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
 Informar código ED20F2C5 EFF6480A A7EA0D43 0D5CCE7