



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

JULIANA CRISTINE ROVANI RODRIGUES

**PAPEL DA TRANSIDROGENASE DE NUCLEOTÍDEO DE NICOTINAMIDA
(NNT) MITOCONDRIAL NO METABOLISMO GLICÍDICO E NO
METABOLISMO LIPÍDICO**

CAMPINAS

2018

JULIANA CRISTINE ROVANI RODRIGUES

**PAPEL DA TRANSIDROGENASE DE NUCLEOTÍDEO DE NICOTINAMIDA
(NNT) MITOCONDRIAL NO METABOLISMO GLICÍDICO E NO
METABOLISMO LIPÍDICO**

*Dissertação/Tese apresentada à
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título
de Doutora em BIOLOGIA FUNCIONAL E
MOLECULAR, na área de fisiologia*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA JULIANA CRISTINE ROVANI
RODRIGUES E ORIENTADA PELA PROF. DRA.
HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA

Orientador: HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/02819-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R769p Rovani, Juliana Cristine, 1988-
Papel da transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida mitocondrial (NNT) no metabolismo glicídico e lipídico / Juliana Cristine Rovani Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Helena Coutinho Franco de Oliveira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. NADP trans-hidrogenases. 2. Insulina - Secreção. 3. Resistência à insulina. 4. Obesidade. I. Oliveira, Helena Coutinho Franco de, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase in glucose and lipids metabolism

Palavras-chave em inglês:

NADP transhydrogenases

Insulin - Secretion

Insulin resistance

Obesity

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Helena Coutinho Franco de Oliveira [Orientador]

Tiago Rezende Figueira

Helena Barbosa Sampaio

Leonardo dos Reis Silveira

Valéria Sutti Nunes

Data de defesa: 31-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 31 de Agosto de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a). Dr (a). Helena Coutinho Franco de Oliveira
(orientadora)

Prof. Dr. Tiago Rezende Figueira

Prof.(a). Dr (a). Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

Prof.(a). Dr (a). Valéria Sutti Nunes

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à instituição base da minha vida: minha família. Ao Tiago, meu marido pelo apoio e incentivo, e aos meus pais, Sebastiana e Nelson, pela persistência na fé e ombro amigo

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a concretização de uma importante etapa em minha vida.

À minha orientadora, Profa. Helena Coutinho Franco de Oliveira pela paciência e constante contribuição no meu amadurecimento científico.

Aos professores, alunos e pesquisadores do laboratório LAPEM que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento intelectual.

Aos professores Roger Frigério Castilho e Aníbal Vercesi pelo amadurecimento científico e a aluna Juliana Ronchi pela doação dos camundongos rederivados.

Aos co-autores Helena Raposo, Emerielle Vanzela, Jean Vettorazzi, Gabriel Dorighello e Claudia Navarro pela ajuda durante a execução dos experimentos e pelo conhecimento teórico.

Em especial, aos amigos que levarei por toda vida: Gabriel Dorighello, Helena Raposo, Júlia Castelli, Leonardo Moi, Leandro Assis, Marta Garcia, Thiago Rentz. Obrigada pela ajuda e colaboração na execução dos experimentos, troca de conhecimentos e companheirismo fora e dentro do laboratório.

Aos técnicos de laboratório Mônica Poletti e Gabriela pela manutenção e organização do laboratório.

Aos funcionários da Unicamp, especialmente Andréia A. Vigilato, Cláudio Cesar Zoppi, Tatiane Ramos e Fabiana Kühne por estarem dispostos a ajudar.

A Carmem por cuidar com carinho e zelar por este local ao qual temos tanta estima.

Ao meu marido e família pela dedicação, paciência e carinho ao longo desses anos.

A Deus pela força e coragem em enfrentar todos os dias um novo desafio.

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Metabolismo de Lípidos** da Área de Fisiologia e Biofísica do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – **UNICAMP**, com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**Fapesp**, processos 2014/02819-0, 2011/50400-0, 2017/17728-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**, processo 304532/2010-0 HCFO), OCRC Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (Fapesp 2013/07607-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) – Programa de Pós - graduação em Biologia Funcional e Molecular da UNICAMP.

RESUMO

A transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida mitocondrial (NNT) é a principal enzima geradora de NA(D)PH em mitocôndrias, o qual é utilizado para detoxificação de peróxido de hidrogênio mitocondrial. Estudos prévios mostraram que a mutação nessa enzima está associada a alterações do estado redox de mitocôndrias, redução de secreção de insulina e aumento de obesidade induzida por dieta em animais C57BL/6J provenientes do Jackson Laboratory (B6-J) quando comparados a linhagens sem esta mutação (por exemplo, C57BL/6JUnib e C57BL/6N). Neste trabalho, investigamos o metabolismo glicídico e lipídico visando entender o papel da NNT na suscetibilidade ao diabetes e à obesidade. Para tanto, estudamos sub-linhagens C57BL6 isogênicas independentes, com e sem mutação da NNT, B6-J e B6-UNI, respectivamente, assim como linhagens congênicas (com >99% de homogeneidade de background genético) com e sem a mutação da NNT (NNT^{-/-} vs NNT^{+/+}). Estes estudos foram realizados tanto com dieta normal (padrão) quanto sob dieta hiperlipídica (*high fat* – HF, 20 semanas).

No primeiro estudo avaliamos o efeito da NNT sobre a homeostase glicêmica. Observamos que, em relação aos não mutantes (B6-UNI), os animais deficientes de NNT (B6-J) apresentaram intolerância à glicose, tanto por deficiência de secreção de insulina quanto por resistência periférica ao hormônio. Nas ilhotas pancreáticas, além da redução de secreção de insulina estimulada por glicose, houve redução de autofluorescência de NAD(P)H e aumento de produção de H₂O₂. Verificamos também que os animais deficientes de NNT apresentaram resistência hepática à insulina determinada pelo teste de conversão de piruvato à glicose e pela redução da sinalização hepática da insulina (fosforilação da AKT). Todos estes achados foram observados tanto em dieta normal como em HF. No entanto, em linhagens congênicas, demonstramos que os animais deficientes de NNT (NNT^{-/-}) também eram intolerantes à glicose, porém com a função secretória de insulina preservada, tanto em dieta normal quanto em HF. A intolerância à glicose nos animais NNT^{-/-} é explicada pela maior resistência periférica à insulina, de modo global (teste de tolerância à insulina) e hepática (conversão de piruvato a glicose e fosforilação da AKT). Baseado em estudos prévios mostrando anormalidades redox em mitocôndrias hepáticas com deficiência de NNT, nossa hipótese é de que estas anormalidades são responsáveis pela resistência hepática à insulina. Assim, tratamos os animais por um mês com o antioxidante TEMPOL, o que

de fato reverteu a intolerância à glicose causada pela deficiência de NNT. Assim, concluímos que a NNT é importante para sinalização hepática de insulina, mas não altera a secreção de insulina. Provavelmente outras diferenças genéticas entre as linhagens B6-J e B6-UNI são responsáveis pelo comprometimento da secreção de insulina estimulada por glicose nos animais C57BL/6J.

No segundo estudo avaliamos o papel da NNT sobre o metabolismo lipídico. Observamos que os animais B6-J deficientes em NNT apresentam aumento de adiposidade corporal e de triglicérides (TG) hepáticos, aumento de leptinemia e redução de metabolismo corporal (respirometria). Estes achados foram obtidos tanto em dieta normal quanto em dieta HF. O aumento de gordura hepática pode ser explicado por aumento de retenção de lípidos da dieta. Quando investigamos as linhagens congênicas, observamos que os animais NNT-/- só permanecem mais obesos quando em dieta hiperlipídica, enquanto a esteatose hepática está presente tanto em dieta normal quanto em HF. Os mecanismos responsáveis pela esteatose hepática estão associados à redução de secreção hepática de VLDL-TG. Assim, propomos que a disfunção mitocondrial prejudica a sinalização da insulina, sendo a resistência à insulina determinante do acúmulo lipídico hepático, principalmente por comprometer a secreção de VLDL. Em síntese, a deficiência da NNT é determinante da adiposidade induzida por dieta, mas não explica diferenças nos depósitos adiposos em dieta normal observadas nas linhagens C57BL/6 independentes. O aumento da adiposidade induzido por dieta é explicado por redução do metabolismo corporal e a esteatose hepática pela resistência à insulina nos animais deficientes de NNT.

Palavras chave: transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida, secreção de insulina, resistência à insulina, obesidade.

ABSTRACT

Mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) is the main source of NA(D)PH in mitochondria, which is used for detoxification of mitochondrial hydrogen peroxide. Previous studies have shown that the mutation in this enzyme is associated with changes in the redox state of mitochondria, reduction of insulin secretion and increase of diet-induced obesity in C57BL/6J mice from the Jackson Laboratory (B6-J) when compared to strains without this mutation (e.g., C57BL/6JUnib). In this work, we investigate the glucose and lipid metabolism in order to understand the role of NNT in the susceptibility to diabetes and obesity. For this, we studied independent isogenic C57BL/6 sub line, with and without mutation of NNT, B6-J and B6-UNI, respectively, as well as congenic lineages (with >99% genetic background homogeneity) with and without the NNT mutation (NNT^{-/-} vs. NNT^{+/+}). These studies were performed with either normal (standard) diet or high fat (HF, 20 weeks) diet.

In the first study we evaluated the effect of NNT on glycemic homeostasis. We observed that in relation to the non-mutants (B6-UNI), NNT deficient animals (B6-J) presented glucose intolerance due to both insulin secretion deficiency and peripheral resistance to the hormone. In the pancreatic islets, in addition to the reduction of insulin secretion stimulated by glucose, there was a reduction of autofluorescence of NAD(P)H and increase of H₂O₂ production. NNT-deficient animals had hepatic insulin resistance as determined by the pyruvate-to-glucose test and reduced hepatic insulin signaling (pAKT). All these findings were observed in both normal and HF diet fed mice. However, in congenic strains, we demonstrated that NNT deficient animals (NNT^{-/-}) were also glucose intolerant, but with secretory insulin function preserved, both in normal and HF diet. Glucose intolerance in NNT^{-/-} animals is explained by increased peripheral insulin resistance, overall (insulin tolerance test) and in liver (conversion of pyruvate to glucose and phosphorylation of AKT). Based on previous studies showing redox abnormalities in hepatic mitochondria with NNT deficiency, our hypothesis is that these abnormalities are responsible for hepatic insulin resistance. Thus, we treated the animals for a month with the antioxidant TEMPOL, which in fact reversed the glucose intolerance caused by NNT deficiency. Thus, we conclude that NNT is important for hepatic insulin signaling, but does not alter insulin secretion. Probably other genetic differences between the B6-J and B6-UNI strains besides NNT mutation

are responsible for the impairment of glucose-stimulated insulin secretion in C57BL/6J animals.

In the second study we evaluated the role of NNT on lipid metabolism. We observed that NNT-deficient B6-J mice present increased body adiposity and hepatic triglycerides (TG), increased leptinemia and reduced body metabolism (respirometry). These findings were obtained both in the normal diet and in the HF diet. Increased liver fat can be explained by increased dietary lipid retention. When we investigated the congenic lines, we observed that the NNT^{-/-} animals only remain more obese when on a hyperlipidic diet, while hepatic steatosis is present in both normal and HF diet. The mechanisms responsible for hepatic steatosis are associated with reduced hepatic secretion of VLDL-TG. Thus, we propose that mitochondrial dysfunction impairs insulin signaling, and insulin resistance is determinant of hepatic lipid accumulation, mainly because it compromises the secretion of VLDL. In summary, NNT deficiency is determinant of diet-induced adiposity but does not explain differences in fat deposits observed in independent C57BL6 strains under normal dietary. The increase in diet-induced adiposity is explained by reduced body metabolism and hepatic steatosis by insulin resistance in NNT-deficient animals.

Key words: nicotinamide nucleotide transhydrogenase, insulin secretion, insulin resistance, obesity.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Efeito da mutação da NNT no metabolismo glicídico

Figura 1: Teste de tolerância à glicose (GTT) (A, D), insulinemia durante o GTT (B, E) e peptídeo C (C) durante o GTT de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J)	60
Figura 2: Secreção de insulina de 1 hora em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).....	61
Figura 3: Autofluorescência de NAD(P)H em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em resposta à estimulação com glicose (16,7 mM).....	62
Figura 4: Liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) (Amplex Ultra Red) em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J)	63
Figura 5: Teste de tolerância à insulina (ITT) de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-).....	64
Figura 6: Produção de glicose hepática a partir do piruvato de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão	65
Figura 7: Sinalização da insulina em fígado. Expressão da Akt e sua fosforilação (Thr 308) em fígado de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão após 5 minutos de injeção ip de insulina (0,1 U/kg) ou salina.....	66
Figura 8: Homeostase glicêmica de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão	67

Figura 9: Homeostase glicêmica de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta hiperlipídica.....	68
Figura 10: Secreção de insulina por 1 hora em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-).....	69
Figura 11: Autofluorescência de NAD(P)H em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em resposta à estimulação com glicose (16,7 e 22,2 mM).....	70
Figura 12: Liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) (Amplex Ultra Red) em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-)	71
Figura 13: Produção de glicose hepática a partir do piruvato em camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão	72
Figura 14: Sinalização da insulina em fígado. Expressão da Akt e sua fosforilação (Thr 308) em fígado de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão após 5 minutos de injeção ip de insulina (0,1 U/kg) ou salina.....	73
Figura 15: Teste de tolerância à glicose (GTT) de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) com e sem tratamento com antioxidante tempol (3 mM) na água de beber durante 1 mês e dieta padrão. Curvas glicêmicas após dose oral de glicose 1,5 g/kg (A). Áreas sob as curvas glicêmicas (AUC) (0-120 minutos) (B) ...	74
Figura Suplementar 01: Homeostase glicêmica de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI e NNT+/+) e mutada (B6-J e NNT-/-) em dieta padrão com 2 meses de idade. Painéis A, B e C: camundongos B6-UNI vs B6-J. Painéis D, E e F: camundongos NNT+/+ vs NNT-/. Curvas glicêmicas após dose oral de glicose (1,5 kg/g) e área sob as curvas (AUC) (A e D). Curvas glicêmica após dose intraperitoneal de insulina (0,75U/kg) e AUC (0-30 minutos) (B e E). Velocidades de decaimento da glicose (K _{ITT}) (0-15 minutos) (C e F).....	75

Capítulo II: NNT e metabolismo lipídico

Figura 1: Balanço alimentar (24 horas) em camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).....85

Figura 2: Indicadores de metabolismo corporal por calorimetria indireta durante os períodos claro e escuro (24 horas) de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).....86

Figura 3: Lipogênese *in vivo*: incorporação de ^3H em lipídios totais pelo tecido adiposo (T.A.) epididimal (A), subcutâneo (B) e fígado (C) em camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão (chow).....87

Figura 4: Retenção de ácidos graxos provenientes da dieta (24 horas) nos tecidos adiposos epididimal (A), subcutâneo (B), marrom (C) e no fígado (D) após dose oral de trioleína marcada com trício (^3H -TO) em óleo de milho (5 uCi e 180 mg/animal) em camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão (chow).....88

Figura 5: Composição corporal e lípides hepáticos de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão (chow)89

Figura 6: Composição corporal e lípides hepático de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta hiperlipídica.....90

Figura 7: Indicadores de metabolismo corporal por calorimetria indireta do período claro e escuro (24 horas) de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-).....91

Figura 8: Retenção de lípides da dieta (^3H -trioleína) no fígado (A) e secreção hepática de VLDL (B-C). Radioatividade determinada 24h após administração oral de trioleína marcada com trício (^3H -TO) em óleo de milho (5 uCi e 180 mg/animal) (A). Concentrações de triglicérides após a injeção intraperitoneal de Triton WR 1339 (500

mg/kg) em camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão (chow) (B).....92

Figura Suplementar 01: Balanço alimentar (24 horas) em camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-). Paineis A e C: ingestão alimentar. Paineis B e D: peso total de fezes secas.....93

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: Efeito da mutação da NNT no metabolismo glicídico

Tabela 1: Concentrações plasmáticas de glicose e insulina de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J)..... 58

Tabela 2: Concentrações plasmáticas de glicose e insulina de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-)59

Capítulo II: NNT e metabolismo lipídico

Tabela 1: Composição corporal e lípidos hepáticos de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão81

Tabela 2: Composição corporal e lípidos hepáticos de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta hiperlipídica82

Tabela 3: Concentrações plasmáticas de lipídios e adipocinas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão83

Tabela 4: Concentrações plasmáticas de lipídios e adipocinas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta hiperlipídica83

Tabela 5: Concentrações plasmáticas de lipídios e adipocina de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão 84

Tabela 6: Concentrações plasmáticas de lipídios e adipocina de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta hiperlipídica84

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT: acil-coenzima A colesterol aciltransferase

ACTH: hormônio adrenocorticotrópico

ADP: adenosina difosfato

AGL: ácido graxo livre

AKT: proteína quinase B

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

Apo: apolipoproteína

ATP: adenosina trifosfato

B6-J: linhagem C57BL6 proveniente do Jackson Laboratory com a NNT mutada

B6-UNI: linhagem C57BL6 proveniente do Cemib com NNT intacta

BAT: *brown adipose tissue*

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animal

CEMIB: Centro Multidisciplinar da Investigação Biológica em Animais de Laboratório

CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado

COL: colesterol

Cyp11a1: *cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1*

DAG: diacilglicerol

DM: diabetes mellitus

DPP-4: dipeptidil peptidase-4

EE: *energy expenditure*

ER: *endoplasmic reticulum*

EROS: espécies reativas de oxigênio

FOXO: *forkhead box protein O*

GDH: glutamate desidrogenase

GIP: peptide inibidor gástrico ou peptídeo insulínico dependente de glicose

GLP-1: *glucagon like peptide-1*

GLUT: transportador de glicose

GRX: glutarredoxina

GSH: glutathiona reduzida

GSSG: glutathiona oxidada

GTT: teste de tolerância a glicose

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HDL: lipoproteína de alta densidade
HF: *high fat*
HMG-CoA: hidroximetilglutaril Coenzima A
IDH2: isocitrato desidrogenase
IDL: lipoproteína de densidade intermediária
IL: interleucina
IMC: índice massa corporal
IR: receptor tirosina quinase de insulina
IRS: substrato do receptor de insulina
ITT: teste de tolerância a insulina
JNK: *C-jun N-terminal kinase*
K_{ATP}: canal de potássio sensível ao ATP
LCAT: lecitina-colesterol aciltransferase
LDL: lipoproteína de baixa densidade
LPL: lipase lipoprotéica
ME: enzima málica
TFAM: fator de transcrição mitocondrial A
NAD⁺: *nicotinamide adenine dinucleotide*
NADH: *reduced nicotinamide adenine dinucleotide*
NADP: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NADP⁺: *oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NADPH: *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NAFLD: doença hepática gordurosa não alcoólica
NNT: transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida
NNT^{-/-}: linhagem congênica com a NNT mutada
NNT^{+/+}: linhagem congênica com a NNT intacta
Nrf2: fator de transcrição NF-E2 relacionado ao fator 2
NASH: esteato hepatite não alcoólica
p38 MAPK: *p38 mitogen-activated protein kinase*
PC: pró-hormônio convertase
Pcsk: pró-proteína convertase
PDH: piruvato desidrogenase
PI3K: fosfatidil-inositol 3 quinase
PIP2: 4,5-bisfosfato fosfatidil-inositol

PIP3: 3,4,5-trifosfato fosfatidil-inositol
PKC: proteína quinase C
PP: polipeptídeo pancreático
Prdx3: peroxiredoxina 3
PTEN: *phosphatase and tensin homolog*
PUFAs: ácidos graxos poliinsaturados
QTL: *quantitative trait locus*
RQ: coeficiente respiratório
SH2: domínio homólogo da Src 2
SNC: sistema nervoso central
SNPs: polimorfismo de um único nucleotídeo
SRB1: receptor “scavenger” classe B tipo 1
TA: tecido adiposo
TG: triglicérides
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
TRX: tioredoxina
Txnrd2: tioredoxina redutase 2
UCP 1: *uncoupling protein*
VCO₂: volume de dióxido de carbono
VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa
VO₂: volume de oxigênio
WAT: tecido adiposo branco
WHO: *World Health Organization*

SUMÁRIO

Resumo	08
Abstract	10
Lista de Figuras	12
Lista de Tabelas	16
Lista de Abreviaturas	17
Introdução	21
1. Homeostase Glicêmica e Diabetes	21
1.1. Diabetes Mellitus	24
1.2. Sinalização a insulina e Resistência periférica ao hormônio	26
1.3. Secreção de insulina pelas células β pancreáticas	29
2. Metabolismo de Lípidos e Obesidade	31
2.1. Obesidade e comorbidades	33
2.2. Doença hepática gordurosa não alcoólica	35
3. Transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (NNT)	37
3.1 Importância de estudos em camundongos congênicos	40
Justificativa do estudo	42
Objetivo geral e específico	43
Fluxograma dos estudos	44
Materiais e Métodos	45
Resultados e Discussão	52
Capítulo I: Efeito da mutação da NNT no metabolismo glicídico	53
Capítulo II: Efeito da mutação da NNT no metabolismo lipídico	76
Conclusões	94
Referências Bibliográficas	95
Anexo 01	109
Anexo 02	110

INTRODUÇÃO

1. HOMEOSTASE GLICÊMICA E DIABETES

A glicose circulante no plasma é derivada de três principais fontes: absorção intestinal no estado alimentado, glicogenólise (clivagem do glicogênio no fígado) e gliconeogênese (formação de glicose no fígado a partir de piruvato, lactato, aminoácidos e glicerol) (Gerich, 1993). Quando a glicose é removida do plasma, ela pode ser armazenada como glicogênio ou pode sofrer glicólise nos tecidos. A glicólise é a via metabólica que converte glicose em piruvato por várias reações enzimáticas, processo que pode ocorrer na presença ou não de oxigênio (Woerle et al, 2003). No processo oxidativo, ocorre a conversão do piruvato em acetil-CoA que é posteriormente oxidada através do ciclo do ácido tricarboxílico formando dióxido de carbono e água. Quando o processo é não-oxidativo, o piruvato pode ser reduzido a lactato ou transaminado para formar alanina.

A manutenção da concentração de glicose plasmática em níveis fisiológicos é essencial para o funcionamento adequado do organismo, em especial do sistema nervoso. Vários estudos mostram que a exposição crônica à concentração de glicose elevada é tóxica para as células de diversos tecidos (Del Prato, 2009; Kaiser et al, 2003). A hiperglicemia é um dos principais fatores envolvidos na disfunção de tecidos como retina, fibras nervosas periféricas e rim, frequentemente observada em pacientes diabéticos (Sarwar et al, 2010; Bourne et al, 2013; Zhang et al, 2017). A hipoglicemia é um quadro preocupante, já que a glicose é praticamente o único substrato utilizado como fonte de energia pelo cérebro em condições fisiológicas, e por esta razão, fundamental para a manutenção do sistema nervoso central (SNC) (Siesjo, 1988). Isso ocorre porque outros possíveis substratos considerados como fonte de energia para o SNC, como corpos cetônicos e ácidos graxos livres, requerem adaptações bioquímicas celulares e, mesmo assim, não tem eficiência para suprir a demanda energética cerebral, seja pelos baixos níveis na circulação ou por limitação no transporte através da barreira hemato-encefálica, respectivamente (Siesjo, 1988). Entende-se que uma breve hipoglicemia pode causar disfunção do SNC e uma hipoglicemia grave prolongada pode levar a morte. No entanto, há eficientes sistemas reguladores nervosos e hormonais capazes de prevenir ou corrigir alterações em sua concentração (Siesjo, 1988).

O nível normal de glicose no plasma é mantido dentro de um intervalo relativamente pequeno que compreende entre 3,3 a 8,8 mmol/L ou 59,4 a 158,4 mg/dl,

apesar de grandes variações nos níveis de glicose depois das refeições e exercícios físicos (Wahren et al, 1978; Alsahli et al, 2017). Para manter a normoglicemia, é essencial o funcionamento de dois sistemas, o sistema regulatório e o contra-regulatório formado pelo sistema neuro-hormonal. Esses dois processos podem ser dependentes ou não de insulina e ambos contribuem para a manutenção da homeostase glicêmica controlando a glicemia no estado de jejum e no período pós-prandial (Gerich, 1993; Gerich, 1988; Röder et al, 2016). Basicamente, quando ocorre um decréscimo nos níveis de glicose plasmático de 20 mg/dl, por exemplo de 90 para 70 mg/dl, há uma redução da liberação de insulina e da captação de glicose em certas áreas do cérebro, como o hipotálamo onde estão localizados os sensores de glicose. Assim, ocorre a ativação do sistema nervoso simpático que desencadeia a liberação de hormônios contra-regulatórios, tais como: glucagon, catecolaminas, cortisol e hormônio do crescimento (Gerich, 1988). Com isso, há o aumento de liberação de glicose no plasma e diminuição da sua remoção restaurando a normoglicemia. Por outro lado, um aumento de 10 mg/dl nos níveis plasmáticos de glicose é capaz de estimular a liberação de insulina e reduzir a secreção de glucagon, que dentre outros efeitos, aumenta a captação de glicose por tecidos insulino-dependentes e inibe a produção hepática de glicose, respectivamente, restaurando a normoglicemia (Gerich, 1988).

A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células β do pâncreas em resposta ao aumento dos níveis plasmáticos de glicose, aminoácidos e outros nutrientes após a ingestão do alimento. Ela regula o metabolismo da glicose de forma direta e indiretamente ao se ligar nos receptores específicos de insulina presentes no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo ativando a sua via de sinalização (Gerich, 1993). Assim, a insulina sinaliza no músculo esquelético o aumento da captação de glicose (Gerich et al, 1974), promove a glicogênese no fígado, e inibe a secreção de glucagon pelas células α pancreáticas, sinalizando para o fígado parar de produzir glicose via glicogenólise e gliconeogênese (Gerich, 1993). No estado pós-prandial, a secreção de insulina ocorre em duas fases. Na primeira fase ocorre a liberação rápida da insulina pré-formada nos grânulos próximos à membrana plasmática, seguida pelo aumento da síntese de insulina. Na segunda fase, a liberação da insulina em longo prazo ocorre quando a concentração de glicose no plasma permanece aumentada, por mobilização dos grânulos de insulina mais distantes da superfície celular (Gerich, 1993). Além da glicose, existem outros fatores que estimulam a secreção de insulina, são eles

aminoácidos (leucina, arginina, lisina) e estimulação parassimpática via nervo vago (Holst, 1994; Drucker, 2001).

Para que ocorra a entrada de glicose nas células-alvo da insulina, é fundamental a presença de proteínas transportadoras denominados GLUTs (Mueckler & Thorens, 2013). Os GLUTs são transportadores que promovem a difusão facilitada de glicose para dentro da célula. Existem transportadores de alta afinidade, exemplo GLUT 1, 3 e 4, os quais são capazes de fornecer glicose em condições basais para as células (Cushman & Wardzala, 1980; Boucher et al, 2004). O GLUT 3 é o principal transportador neuronal. O GLUT 4 é o que medeia a captação de glicose estimulada por insulina no músculo esquelético, coração e tecido adiposo. Além dessas isoformas, existem também os de baixa afinidade pela glicose, como o GLUT 2 que estão presentes em células β e em tecidos expostos a grandes fluxos de glicose, como intestino, fígado e rim (Cushman & Wardzala, 1980; Bouché et al, 2004).

O glucagon é um hormônio catabólico, secretado pelas células α do pâncreas e com função contra-regulatória da insulina no controle da glicemia comparado, pois no estado de jejum o glucagon estimula a produção de glicose hepática (glicogenólise) para restaurar a normoglicemia no plasma (Unger, 1971; Unger & Cherrington, 2012). A secreção de glucagon é inibida pela hiperglicemia e estimulada pela hipoglicemia (Gerich, 1981).

As catecolaminas são liberadas durante o período de estresse e na condição de hipoglicemia. As ações metabólicas das catecolaminas são mediadas através dos receptores beta-adrenérgicos, inibindo a secreção pancreática de insulina e diminuindo a ação periférica da insulina (Gerich et al, 1980). No fígado, as catecolaminas aumentam diretamente a glicogenólise e aumentam a disponibilidade de substratos gliconeogênicos e de AGL (Gerich et al, 1980). No rim, as catecolaminas são potentes estimuladores da gliconeogênese. Nos músculos esqueléticos, elas reduzem a captação de glicose e estimulam glicogenólise, que provoca um aumento do lactato, que se difunde para o plasma, constituindo um importante precursor gliconeogênico. No tecido adiposo, elas estimulam a lipólise que resulta em um aumento na liberação de AGL e glicerol. O primeiro constitui uma fonte de energia alternativa e o segundo outro precursor chave da via da gliconeogênese (Rizza et al, 1980).

O hormônio do crescimento e o cortisol também apresentam ações contra-regulatórias à ação da insulina para manutenção da glicemia. Esses hormônios reduzem

a capacidade da insulina em inibir a liberação hepática de glicose. Ambos os hormônios aumentam a síntese de enzimas gliconeogênicas (DeFeo et al, 1989; DeFeo et al, 1989).

Além dos hormônios citados acima, em condições fisiológicas, a concentração de glicose no plasma pode ser regulada também pelos níveis plasmáticos de AGL e incretinas (Gerich, 1993). Os AGL são fontes de energia para diversos tecidos do corpo, exceto cérebro, células sanguíneas e medula renal. Os níveis aumentados de AGL plasmáticos causam estimulação da gliconeogênese hepática e renal, inibição do transporte de glicose no músculo e competição com a glicose como combustível oxidativo (Fanelli et al, 1993). Os níveis circulantes de AGL são regulados pelos hormônios contra-regulatórios, especialmente o hormônio de crescimento, pela baixa concentração de insulina e pelo sistema nervoso simpático, os quais resultam em aumento de lipólise e consequentemente dos níveis de AGL no plasma. A insulina reduz a concentração de AGL no plasma por reduzir a lipólise e aumentar o *clearance* dos AGL (Fanelli et al, 1993; McGarry, 1998).

As incretinas são peptídeos secretados pela mucosa intestinal minutos após a ingestão de nutrientes e estimulam o pâncreas a secretar insulina. Esses peptídeos têm a meia-vida curta devido a uma rápida inativação pela enzima proteolítica denominada dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) (Brown et al, 1975). As incretinas conhecidas como, GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) e GIP (*gastric inhibitory polypeptide*) inibem a secreção de glucagon e estimulam a secreção de insulina (Nauck et al, 2002). Ambos atrasam o esvaziamento gástrico e o GLP-1, através de um mecanismo neural, promove a saciedade, diminuindo a ingestão de alimentos e levando à perda de peso (Baggio & Drucker, 2007).

Sabe-se que um desequilíbrio na homeostase glicêmica conhecida como intolerância à glicose (hiperglicemia após ingestão de glicose ou no período pós-prandial) pode ser explicada tanto por uma disfunção das células β em secretar a quantidade necessária de insulina, quanto por defeitos na sinalização da insulina nos tecidos alvos, processo denominado de resistência à insulina (Prentki & Nolan; 2006). Ambos os defeitos são fatores de risco para desenvolvimento do diabetes mellitus.

1.1 Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por um quadro de hiperglicemia resultante de defeitos na ação da insulina nos tecidos periféricos ou pelo prejuízo na secreção de insulina, ou ainda em ambos os distúrbios. A hiperglicemia

crônica do diabetes resulta em distúrbios metabólicos generalizados e toxicidade para vários tecidos (WHO, 2006; ADA, 2014). Esta doença atinge mais de 8% da população adulta mundial (Guariguata et al, 2014). Em 2012, Scully mostrou que nos próximos 20 anos, o DM afetará mais de 500 milhões de indivíduos em grande parte do mundo, devido ao aumento do estilo de vida sedentário e da incidência de obesidade (Scully, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os critérios de diagnóstico para a DM incluem: glicose plasmática acima de 126 mg/dL (7,0 mmol/L) no estado de jejum, ou acima de 200 mg/dL (11,1 mmol/L) 2 horas após uma sobrecarga oral de 75 g de glicose (WHO, 2006; ADA, 2014); o nível de hemoglobina glicada maior ou igual a 6,5% (WHO, 2011). Níveis plasmáticos de glicose maior ou igual a 140 mg/dl e menor ou igual que 200 mg/dl 2 horas após uma sobrecarga oral de 75 g de glicose e glicemia de jejum entre 110 e 125 mg/dl são critérios para diagnóstico de intolerância à glicose, condição que predispõe o indivíduo ao diabetes, (ADA, 2014).

O DM pode ser dividido em quatro grandes grupos de maior incidência: o DM do tipo 1 (DM1), DM do tipo 2 (DM2), DM gestacional e DM monogênica (Thomas & Philipson, 2015). Estima-se que cerca de 1 em cada 11 adultos no mundo tem DM, sendo que 90% destes são diagnosticados com DM2. A Ásia é uma área importante da epidemia global de DM2 em rápido crescimento, especialmente China e Índia (Zheng et al, 2018). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, a incidência de jovens (<20 anos) que apresentam o DM1 em todo o mundo é estimada em 1.106.500 milhões (IDF Diabetes Atlas, 2017).

O DM1 é uma doença auto-imune que aparece principalmente ainda na infância, geralmente crianças não obesas e que frequentemente apresentam quadro de cetoacidose (ADA, 2007). Entretanto, o DM2 é decorrente do aumento da prevalência de obesidade, sedentarismo e dieta desbalanceada (Ershow, 2009) e pode ser desenvolvido pela combinação da resistência à insulina nos tecidos periféricos e disfunção da célula β , em geral decorrente de exaustão para compensar a resistência periférica e manter a normoglicemia (Kasuga, 2006). Embora muitos indivíduos obesos que tendem a ter resistência à insulina, alguns ainda não desenvolvem DM. Isso ocorre porque as suas células β continuam funcionando adequadamente, e elas são capazes de manter a homeostase da glicose e compensar o aumento da resistência à insulina com o aumento da secreção de insulina (Thomas & Philipson, 2015). Fatores genéticos também

influenciam no desenvolvimento do DM1 e DM2 (Robertson & Rich, 2018; Rampersaud et al, 2007).

Estudos sugerem que a perda da massa de células β pode contribuir para um prejuízo na secreção de insulina em pacientes com DM2, pois mostraram uma redução de 50% na massa de células β desses indivíduos e aumento de 60% no volume destas células em diabéticos obesos quando comparados aos indivíduos saudáveis (Maclean & Ogilvie, 1955; Butler et al, 2010). Por outro lado, Rahier e colaboradores sugerem que a diferença no número de células β é de somente 25% entre indivíduos saudáveis e com DM2, assim uma pequena mudança é suficiente para causar os sintomas da doença (Rahier et al, 2008). Um prejuízo nos níveis plasmáticos de glicose no estado de jejum também pode estar associado à redução no volume das células β , sugerindo que este é um processo inicial e relevante para o desenvolvimento do DM2 (Butler et al, 2010).

Existem duas hipóteses plausíveis, não excludentes, que poderiam explicar o comprometimento da função das células β no DM2, são elas: glicotoxicidade, em que a hiperglicemia crônica depleta os grânulos de insulina das células β e a lipotoxicidade, onde o aumento crônico dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres diminuem a conversão de pró-insulina em insulina, conseqüentemente diminuindo a secreção de insulina (Del Prato, 2009). Além disso, são especialmente relevantes para o estabelecimento de um estresse oxidativo na célula beta, a qual já é conhecida por ter baixas defesas antioxidantes, o que leva a morte celular. Alguns estudos vêm relacionando a mutação de uma enzima mitocondrial denominada transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (NNT), importante para detoxificação de espécies reativas de oxigênio da mitocôndria, com um prejuízo na secreção de insulina (Toye et al, 2005; Freeman et al, 2006).

1.2 Sinalização da insulina e resistência periférica ao hormônio

A sinalização da insulina ocorre via a ação do hormônio sobre seu receptor tirosina quinase (IR) (Boucher et al, 2014; Nef et al, 2003). O IR é um tetrâmero que consiste de duas subunidades α extracelulares e duas subunidades β transmembranares ligadas por pontes de dissulfeto (Mosthaf et al, 1990). Esse receptor apresenta duas isoformas, a isoforma A presente em tecidos fetais e cérebro e a isoforma B altamente expressa em fígado (Frasca et al, 1999; Mosthaf et al, 1990). A ligação da insulina a subunidade α do seu receptor (IR), promove mudança conformacional da proteína, ativando sua subunidade β , que se autofosforila e recruta substratos do receptor de

insulina (IRS), tais como IRS1 ao IRS6, para mediar a sinalização downstream da insulina (Sun et al, 1991; Sun et al, 1995; Lavan et al, 1997; Cai et al, 2003; White, 2006; Shaw, 2011).

No fígado a ativação do IR pela insulina promove a fosforilação do IRS2 (Cheng et al, 2010). A mudança conformacional e autofosforilação dos receptores IR leva ao recrutamento e fosforilação de IRS2 e da proteína SH2 (proteína com domínio homólogo da Src 2). O IRS2 é fosforilado nos resíduos de tirosina, apresentando sítios de ligação para SH2, que recruta e ativa a fosfatidilinositol bifosfato - 3 quinase (PI3K) (Sun et al, 1993; Myers et al, 1992; Shaw, 2011; Hanke & Mann, 2009). Esta fosforila o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para gerar o segundo mensageiro fosfatidilinositol (3,4,5)- trifosfato (PIP3) (Boucher et al, 2014). O PIP3 ativa a PDK-1 (proteína quinase 1 dependente de fosfoinositídeo) que, por sua vez, recruta a Akt2 (*RAC-beta serine/threonine-protein kinase* ou proteína quinase B, isoforma mais abundante em tecidos sensíveis à insulina) para a membrana plasmática e a ativa fosforilando-a (Alessi et al, 1997; Franke et al, 1997). A Akt2 fosforilada inibe a produção de glicose hepática através de dois mecanismos chave: primeiro, diminui a expressão de enzimas gliconeogênicas pela fosforilação e exclusão nuclear da proteína FOXO 1 e seus alvos pró-gliconeogênicos, e segundo, ativa a glicogênio sintase por fosforilação (inativação) da glicogênio sintase quinase-3 β (Perry et al, 2014).

A resistência à insulina induzida pela obesidade pode ser caracterizada por disfunções como: redução da expressão do IR e da sua atividade quinase, redução da concentração e fosforilação do IRS1 e IRS2, redução da atividade PI3K, e consequente translocação do transportador de glicose (GLUT4) e da atividade de diversas enzimas intracelulares (Pessin & Saltiel, 2000), bem como de aumento na translocação do PKC ϵ (proteína quinase C do tipo epsilon) (Jornayvaz & Shulman, 2012), as quais inibem a sinalização da insulina ao nível do próprio receptor de insulina .

Fatores genéticos ou adquiridos também afetam a sensibilidade periférica a insulina e, portanto, podem desencadear um quadro de resistência a insulina. As causas genéticas podem estar relacionadas a mutações ou polimorfismos nos genes do IR, PI3K, PTEN (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*) e Akt2, entre outros (Boucher et al, 2014).

O acúmulo do diacilglicerol (DAG), metabólito derivado de lipídios complexos, no músculo esquelético e no fígado também induz resistência à insulina. No músculo esquelético, o aumento de DAG leva a resistência à insulina por ativar a PKC θ (*protein*

kinase C-theta) e induzir a fosforilação do IRS-1 em Ser-307 (Yu et al, 2002). Enquanto no fígado, o acúmulo do DAG ativa a PKC ϵ , que inibe o IR conforme mencionado acima. O aumento do conteúdo de DAG no fígado pode ser devido ao: aumento de remanescentes quilomícrons secundários do aumento da ingestão de uma dieta rica em gordura e aumento dos níveis de AGL liberados pelos adipócitos. O aumento de aporte de AGL para o fígado pode levar a lipogênese incompleta, saturação do mecanismo de exportação de lípidos, bem como metabolização mitocondrial incompleta dos ácidos graxos, levando a um aumento do conteúdo de DAG e de outros metabólitos intermediários implicados na resistência à insulina (Jornayvaz & Shulman, 2012; Samuel et al., 2004). A fosforilação diminuída da Akt2 desencadeia dois importantes mecanismos que resulta na diminuição da síntese de glicogênio e o outro no aumento da gliconeogênese, aumentando a liberação de glicose para o plasma pelo GLUT2 (Jornayvaz & Shulman, 2012). Além disso, os níveis aumentados de AGL circulantes derivados dos adipócitos induzem a ativação da via da JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), que também inibe a sinalização da insulina (Schenk et al, 2008).

A expansão do tecido adiposo ocorre em resposta a uma dieta hipercalórica, e está associada a um aumento da infiltração de células imunes e uma resposta pró-inflamatória (Sun et al, 2011), pois tanto os adipócitos quanto os macrófagos presentes no tecido são capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias, recrutando células do sistema imune e induzir resistência à insulina (Kamei et al, 2006).

A glicose em concentrações supra fisiológicas no plasma cronicamente é capaz de alterar a sensibilidade à insulina no músculo esquelético e adiposo, bem como diminuir a secreção de insulina pelas células β (Leahy et al, 1986; Hager et al, 1991).

Outro mecanismo também capaz de causar resistência periférica à insulina é a disfunção mitocondrial e o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são moléculas altamente reativas geradas durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria e consideradas responsáveis pela disfunção mitocondrial e celular quando produzidas em excesso (Chang & Chuang, 2010). Já se sabe que baixos níveis de EROs são essenciais para diversas vias de sinalização celular, inclusive a da insulina (Krieger-Brauer & Kather, 1992; Mahadev et al, 2000). No entanto, concentrações muito elevadas de EROs geram um quadro de estresse oxidativo. Este, por sua vez ativa as MAP- quinases e AMPK que fosforilam os IRS em serina (fosforilação inibitória) causando resistência a insulina (Rudich et al, 1998; Evans et al, 2005; Dokken et al, 2008). Além disso, o estresse oxidativo altera a

dinâmica mitocondrial (que reflete sua atividade e função), aumentando os eventos de fissão mitocondrial, o que está associado a resistência à insulina (Jheng et al, 2012). A inibição do processo fissão mitocondrial diminui a atividade da p38 MAPK (Roux & Blenis, 2004) e aumenta a ativação do IRS-1 e da Akt, resultando na melhora do quadro de resistência à insulina (Jheng et al, 2012).

1.3 Secreção de insulina pelas células β

O pâncreas endócrino constituído pelas ilhotas de Langerhans produz e libera vários hormônios regulatórios da homeostase e metabolismo energético (Chandra & Liddle 2009). As ilhotas correspondem a apenas 1 a 2% do volume total do pâncreas (McEvoy, 1981; Chandra & Liddle 2009). Em humanos, as ilhotas pancreáticas são compostas por 5 tipos celulares sendo que cada célula é responsável por liberar um tipo de hormônio, como: células α que secretam o glucagon e representam ~20% da ilhota total; as células β produzem insulina, peptídeo C e amilina e representam ~70% da composição celular da ilhota (Brissova et al, 2005); células γ produzem polipeptídeo pancreático (PP) que compreende <5% da composição celular da ilhota (Katsuura et al, 2002); células δ produtoras de somatostatina constituindo de <10% das células totais (Brissova et al, 2005) e células ϵ secretoras de grelina que correspondem a <1% das células da ilhota total (Wierup et al, 2002). Na ilhota pancreática de humanos, as células beta se encontram distribuídas mais na periferia, enquanto as células α e δ estão localizadas em todo o interior das ilhotas (Brissova et al, 2005). Em roedores, as células β se concentram mais no núcleo da ilhota com outras células endócrinas dispostas à periferia, tais como células α , células δ , juntamente com polipeptídeo P (PP) e células ϵ (Rahier et al, 1983).

A célula β é o tipo de célula predominante em ilhotas pancreáticas de mamíferos e é a única fonte de insulina circulante (McEvoy, 1981; Röder et al, 2016). Dentro das células β , a insulina sintetizada é primeiramente produzida como pró-insulina e convertida em insulina pela ação das convertases pró-hormônio (PC1, PC2, codificadas por *Pcsk1* e *Pcsk2*, respectivamente) durante o tráfego de vesículas secretoras de insulina (Turner & Arvan, 2000). A insulina ativa é armazenada dentro de grânulos secretores (5 a 10.000 por célula) onde cada célula contém cerca de 30.000 ou mais moléculas de insulina (Fava et al, 2012). A regulação fina da liberação dos grânulos de insulina é suficiente para regular os níveis de glicose no sangue em condições

fisiológicas e essa regulação é importante para prevenir os quadros de hiperglicemia e hipoglicemia (Rorsman & Renström, 2003).

O modelo clássico da secreção de insulina estimulada por glicose pelas células β depende do catabolismo oxidativo da glicose (Rutter et al, 2015). As células β são sensores da glicemia por produzirem uma ativação proporcional do metabolismo glicolítico e oxidativo resultando em aumento da produção de ATP e da razão ATP/ADP (Panten & Ishida, 1975; Pralong et al, 1990). O fluxo de vias alternativas, incluindo a via da pentose fosfato, é geralmente pequeno, embora possa ser aumentado em algumas circunstâncias (Ashcroft et al, 1972; Verspohl et al, 1979). Uma concentração elevada de glicose no sangue estimula a fosforilação oxidativa da glicose aumentando a relação ATP/ADP. Este aumento causa o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), o que despolariza a membrana plasmática, ativa os canais de cálcio voltagem dependente, aumenta o nível de cálcio livre no citosol permitindo que ocorra a migração e fusão dos grânulos contendo insulina com a membrana e promovendo a exocitose da insulina (Henquin, 2000; Rutter et al, 2015).

A secreção de insulina estimulada por glicose é bifásica. A primeira fase com duração de 3 a 10 minutos tem um pico em torno de 5 minutos após o estímulo da glicose onde vai ocorrer a liberação da insulina, e é seguido por uma segunda fase gradualmente crescente, mais lenta, que pode durar 60 minutos ou mais (Rorsman & Renström, 2012; Rutter, 2004). A segunda fase reflete uma resposta autonômica do sistema nervoso parassimpático na ilhota (Ahrén & Holst, 2001). A primeira fase da secreção de insulina é prejudicada no diabetes mellitus tipo 2 (Nesher & Cerasi, 2002).

O estado redox da célula β também é importante para a manutenção da secreção de insulina, uma vez que, as EROs em níveis fisiológicos funcionam como moléculas sinalizadoras para as células (Rhee, 2006), e estão acopladas ao metabolismo da glicose e respiração celular (Bindokas et al, 2003) que são processos fundamentais para induzir a secreção de insulina. Entretanto, já se sabe que o excesso de EROs causa um prejuízo na função da células β , pois estas são vulneráveis aos seus efeitos deletérios (Lenzen, 2008) por apresentarem baixos níveis de catalase e glutathione peroxidase (GSH) contribuindo para maior sensibilidade à lipotoxicidade e glicotoxicidade (Robertson et al, 1992; Newsholme et al, 2007; Gehrman et al, 2010). Por outro lado, as células β apresentam mecanismos de defesa antioxidante, tais como, o fator de transcrição NF-E2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) ativado por níveis aumentados de EROs resulta em

aumento de enzimas antioxidantes protegendo as células dos danos oxidativos (Pi et al, 2003).

Na secreção de insulina, o NADH e NADPH são considerados moléculas reguladoras para o processo de exocitose dos grânulos de insulina induzida por cálcio e ATP. Após estimulação com alta concentração de glicose, ocorre rápido aumento do conteúdo de NAD(P)H (Van De Winkel & Pipeleers, 1983; Kiekens et al, 1992). Estudo de Ivarsson e colaboradores (2005) propõe que o efeito do NAD(P)H na exocitose dos grânulos de insulina pode ser mediado por proteínas antioxidantes, como glutaredoxina (GRX) e tioredoxina (TRX) que estão presentes no citosol das células β , pois são duas proteínas fornecedoras de elétrons para o NADPH. Esse evento ocorre com base nas seguintes evidências: 1) expressão do RNAm do GRX é muito alto em células β em relação a outros tecidos estudados, e a expressão da proteína GRX é alta nas ilhotas e no cérebro; 2) GRX e TRX estão localizadas em micro domínios distintos no citosol das células β ; e 3) GRX potencializa o efeito do NADPH na exocitose dos grânulos de insulina, enquanto que a TRX antagoniza o efeito do NADPH. Assim, os autores sugerem que existe uma regulação redox entre essas moléculas NADPH/GRX/TRX e esta regulação medeia uma nova via de sinalização da secreção de insulina estimulada por glicose (Ivarsson et al, 2005).

O fluxo de carbono da glicose ou glutamina para o glutamato também pode melhorar a síntese de glutatona reduzida (Newsholme et al, 2012), contribuindo para a estimulação aguda da secreção de insulina e à resistência da célula β ao estresse oxidativo.

2. METABOLISMO LIPÍDICO E OBESIDADE

Os lipídios são moléculas hidrofóbicas com função de reserva energética, estrutural (membranas) e reguladora (hormônios, coenzimas, segundos mensageiros e diversos sinalizadores) dentro do organismo (Mattes, 2005; Huang & Freter, 2015). Assim, o metabolismo lipídico está envolvido nos processos de crescimento celular, proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose, inflamação e homeostase da membrana (Huang & Freter, 2015; Zechner et al, 2012; Krycer et al, 2010).

Há diversas classificações possíveis para esta classe de moléculas tão diversa quimicamente. De acordo com o Comitê de Nomenclatura e Classificação de Lipídio Internacional, os lipídios são classificados em 8 categorias, a saber: ácidos graxos,

glicerofosfolipídios, glicerolipídios, esfingolipídios, esteróis, prenóis (*prenol lipids*), sacarolipídios ou glicolipídeos, e policetídios (Huang & Freter, 2015).

Por serem insolúveis no meio aquoso, precisam de um sistema de transporte especializado tanto intra como extra-celular. No plasma, os lipídios estão organizados em macroagregados com proteínas, denominados lipoproteínas. Essas partículas são compostas por lipídios polares e apolares e proteínas específicas denominadas apolipoproteínas (apoLP). As apoLP têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas, como a formação intracelular das partículas lipoproteicas (apoB100 e apoB48), ligantes de receptores de membrana (apoB100 e apoE), ou cofatores enzimáticos, como as apos CII, CIII e AI (Mahley et al, 1984; Kaul et al, 2016).

Existem quatro grandes classes de lipoproteínas:

I- Quilomicrons: ricas em triglicérides são as maiores e menos densas dentre as lipoproteínas. São moléculas sintetizadas e secretadas pelas células intestinais para transportar triglicérides (TG) e colesterol da dieta para tecidos periféricos e fígado. Enquanto os quilomicrons circulam, os seus triglicerídeos são hidrolisados no plasma pela ação da lipase lipoproteica (LPL), uma enzima localizada na superfície endotelial de capilares do tecido adiposo e músculo. Os remanescentes de quilomicrons depletados em TG são reconhecidos principalmente por receptores hepáticos e captados para metabolização neste órgão (Mahley et al, 1984; Feingold & Grunfeld, 2018).

II- Lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL- *very low density lipoprotein*): também ricas em triglicérides, são menores e mais densas que os quilomicrons. As VLDL são sintetizadas e secretadas pelo fígado, sendo liberadas na circulação periférica. A formação das partículas de VLDL no fígado requer a ação de uma proteína intracelular, a chamada proteína chaperona microsomal (MTP – *microsomal triglyceride transfer protein*) que auxilia a transferência e adição de TG durante a tradução das moléculas de apoB100 (Cuchel et al, 2007). Os triglicerídeos das VLDL também são hidrolisados pela LPL na circulação sanguínea. Os ácidos graxos assim liberados são redistribuídos para os tecidos, os quais podem ser armazenados no tecido adiposo ou prontamente utilizados pelos músculos esqueléticos. Por ação da LPL, as VLDL transformam-se em remanescentes (IDL – *intermediary density lipoprotein*) que também são removidos pelo fígado por receptores específicos. Parte das IDL continua sendo lipolizadas pela LPL gerando as lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *low density lipoprotein*) (Dallinger-Thie et al, 2010).

III- Lipoproteínas de baixa densidade (LDL- *low density lipoprotein*): diferente das anteriores, estas são ricas em colesterol e pobres em TG. Ao serem capturadas pelos receptores de LDL presentes na maior parte das células do organismo, mas principalmente nos tecidos esteroidogênicos, desencadeiam ações regulatórias elucidadas pelos prêmios Nobel Brown e Goldstein: 1- o colesterol livre pode ser esterificado para depósito por ação da enzima Acil-CoA: Colesteril Aciltransferase (ACAT), 2- o excesso de colesterol inibe a HMG-CoA redutase, enzima limitante da biossíntese de colesterol e 3- o excesso de colesterol inibe a síntese de receptores de LDL. Assim, a célula regula síntese e captação de colesterol conforme suas necessidades e também previne um eventual acúmulo tóxico de colesterol. No organismo como um todo, a expressão dos receptores de LDL nos hepatócitos é a principal responsável pelo controle do nível de colesterol no sangue. Quanto maior o nível de receptores de LDL hepáticos, menor a colesterolemia. Portanto, tanto a síntese (HMG-CoA redutase) como a captação de LDL (receptores de LDL) são importantes alvos terapêuticos para o tratamento da hipercolesterolemia (Goldstein & Brown, 2015; Ridker, 2014).

IV- Lipoproteínas de alta densidade (HDL- *high density lipoprotein*): as menores e mais densas das lipoproteínas, ricas em colesterol e proteínas, são formadas no fígado, no intestino, na circulação e interstício. Seu principal conteúdo protéico é a apo AI e apo AII. O colesterol livre da HDL, recebido das membranas celulares, é esterificado por ação da Lecitina-Colesterol-Aciltransferase (LCAT) (Feingold & Grunfeld, 2018). A HDL transporta o colesterol até o fígado, via interação com os receptores SR-B1. O circuito de transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado é denominado transporte reverso do colesterol. A HDL também tem outras ações anti-aterogênicas, como: antioxidante, antitrombótica, e de proteção das células endoteliais (Feingold & Grunfeld, 2018).

Alterações das lipoproteínas plasmáticas podem ser determinantes para desenvolvimento de doenças cardiovasculares, especialmente elevação de LDL e de remanescentes de VLDL e diminuição de HDL. As alterações das lipoproteínas podem ser decorrentes de fatores genéticos ou ambientais. Em geral diabetes e obesidade resultam em um perfil de lipoproteínas aterogênico.

2.1 Obesidade e comorbidades

O tecido adiposo branco é um órgão que armazena energia na forma de TG, e quando em escassez de energia, disponibiliza seus estoques, liberando os ácidos graxos

(AG) para circulação. Em condições fisiológicas mecanismos homeostáticos finamente regulados (nervosos e hormonais) são capazes de equilibrar os processos de armazenamento e mobilização dos lipídios, bem como o tamanho dos depósitos adiposos (Unger, 2002).

O tecido adiposo é dividido em dois grandes grupos, o branco (WAT – *White Adipose Tissue*) e o marrom (BAT – *Brown Adipose Tissue*). O WAT se caracteriza pela localização anatômica e presença de células parenquimais contendo uma única gota lipídica de tamanho grande que ocupa 80% ou mais do volume da célula. Esse tecido pode ser remodelado sob condições fisiológicas e farmacológicas para um fenótipo mais oxidativo (Vegiopoulos et al, 2010). Em relação ao BAT, ele é um tecido altamente oxidativo contendo células lipídicas multiloculares com abundância de mitocôndrias que oxidam o AGL gerando calor através da ativação da proteína desacopladora UCP1. O BAT é conhecido como o tecido responsável pela termogênese sem tremor (*nonshivering*) principal mecanismo termorregulador dos mamíferos (Foster & Frydman, 1978; Thurlby & Trayhurn, 1979). Hoje há evidências de que a termogênese do BAT e o “*browning*” de outros depósitos adiposos pode contribuir para regulação do balanço energético e prevenir obesidade (Cui & Chen, 2016).

O balanço energético positivo por período prolongado (Ingestão>Gasto energético) leva a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo branco, o que caracteriza a obesidade. Adipócitos hipertrofiados são disfuncionais e secretam diversas adipocinas e quimiocinas que recrutam e ativam células pró-inflamatórias do sistema imune. Assim, nos obesos, o tecido adiposo apresenta aumento da infiltração de macrófagos, aumento da expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, além de uma hipóxia local (Weisberg et al, 2003) e deficiência de adiponectina (Turer et al, 2012). Este tecido se torna inflamado e resistente à insulina, aumentando o fluxo de AG para o fígado (Kottronen et al, 2008).

Devido ao estado crônico de inflamação subclínica dos obesos ocorre resistência à insulina e aumento de lipólise, elevando os níveis de AGL na circulação e favorecendo o depósito ectópico de gordura em tecidos não adiposos (Guilherme et al, 2008; Lafontan, 2014). A deposição ectópica e intracelular de gordura em tecidos não adiposos é a origem da toxicidade e co-morbidades da obesidade.

A obesidade é uma doença que se tornou epidêmica pelo crescimento acelerado na população no geral. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano como resultado do excesso de peso ou obesidade

(WHO, 2018). O índice de massa corporal (IMC) é uma medida importante para avaliar o grau de sobrepeso e serve como marcador na associação da obesidade com as taxas de mortalidade. O IMC para uma população adulta deve estar na faixa de 21 a 23 kg/m², enquanto a meta para indivíduos deve estar na faixa de 18,5 a 24,9 kg/m². Existe um risco aumentado de co-morbidades para IMC entre 25,0 a 29,9, e risco moderado a grave de co-morbidades para IMC superior a 30 (WHO, 2018).

O sobrepeso e a obesidade são fatores de risco para câncer de mama, cólon, próstata, endométrio, rim e vesícula biliar, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), aterosclerose, infarto do miocárdio e outros distúrbios metabólicos (WHO, 2018; Hotamisligil, 2006; Zeyda & Stulnig, 2009; Guilherme et al, 2008). A resistência à insulina e diabetes tipo 2 relacionados à obesidade são caracterizados pelas diversas alterações na secreção e ação da insulina, como as mencionadas nos tópicos anteriores desta sessão, e estão associadas com excesso de lípidos circulantes (especialmente AGL) e inflamação.

2.2 Doença hepática gordurosa não alcoólica ou esteatose hepática

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD: *non-alcoholic fatty liver disease*) é iniciada pelo acúmulo de TG dentro dos hepatócitos. A terminologia “não alcoólica” deve-se ao fato de que as alterações observadas não estão associadas ao consumo de álcool, no entanto, é importante ressaltar que é pouco distinguível morfológicamente daquelas induzidas pelo álcool (Chalasani et al, 2012; Sakhuja, 2014). A NAFLD é considerada uma doença epidêmica, pois a sua prevalência representa 20% da população geral. Entre pacientes portadores de diabetes tipo 2, a prevalência pode atingir até 70% (Cornier et al, 2008) e este índice sobe para 90% quando a população é de obesos (Haentjens et al, 2009; Vernon et al, 2011). Além disso, a quantidade de gordura particularmente visceral correlaciona-se positivamente com a quantidade de gordura no fígado (Anstee et al, 2013).

Diversos estudos publicados mostram que o desenvolvimento da esteatose hepática está associado com múltiplas disfunções cardiometabólicas, como obesidade (Wong & Ahmed, 2014), resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (Portillo-Sanchez et al, 2015; Ande et al, 2016), dislipidemia (Chalasani et al, 2012) e doenças cardiovasculares (Pacífico et al, 2010). Assim, considera-se que a NAFLD também é característica da síndrome metabólica (Michelotti et al, 2013; Marengo et al, 2016;

Ratzliff et al, 2010; Lonardo et al, 2016, Yki-Järvinen, 2014), definida pelo conjunto de 3 ou mais dos distúrbios acima. Além disso, já se sabe que a NAFLD está relacionada com o aumento do risco de complicações tromboembólicas, pois o fígado é responsável por produzir diversos fatores de coagulação.

A esteatose hepática quando está associada à inflamação evolui para um quadro de esteato hepatite não alcoólica (NASH), a forma mais grave de NAFLD e um potencial precursor de carcinoma hepatocelular (Marengo et al, 2016; Chalasani et al, 2012). A inflamação consiste de focos de infiltração de macrófagos, linfócitos e neutrófilos em áreas acometidas pela esteatose hepática (Takahashi et al, 2012). A característica morfológica conhecida como balonização é decorrente de alteração da permeabilidade da membrana dos hepatócitos e está diretamente relacionada ao risco de progressão da doença resultando em morte celular e fibrose (Caldwell & Argo, 2010). A patogênese exata da NASH ainda não está completamente esclarecida. O modelo inicialmente proposto é conhecido como o de "*two hits*", sendo a esteatose hepática o primeiro "hit", seguido de um segundo "hit" de inflamação e/ou estresse oxidativo provocados por citocinas inflamatórias e disfunção mitocondrial que levam a NASH (Day & James, 1998; Day, 2006). Hoje uma hipótese mais complexa chamada "*multiple hits*" é proposta para explicar como ácidos graxos ou seus metabólitos promovem NASH através de múltiplas vias citotóxicas sequenciais ou paralelas. No geral, a hipótese prediz que a lipotoxicidade ocorre devido a exaustão das respostas adaptativas e regenerativas do hepatócito acumulando progressivamente estresses, disfunções, morte celular, fibrose e culminando com o rompimento da cito-arquitetura que caracteriza a cirrose (Hansen et al, 2017).

Consumo crônico de dietas ricas em gordura, obesidade e resistência à insulina co-existem. Na obesidade, o aumento da massa de tecido adiposo resulta em aumento de *turnover* de AGL e seu maior aporte ao fígado. Frente ao maior aporte de AGL, o fígado aumenta à beta-oxidação dos AG, sintetiza TG, produz e secreta VLDL (Donnelly et al, 2005). Quando estas respostas compensatórias não são suficientes, estabelece-se a esteatose hepática. A ingestão elevada de açúcares simples também predispõe a obesidade e esteatose hepática (de Koning et al, 2012; Malik et al, 2010; Fung et al, 2009). Neste caso, a elevação da lipogênese de novo converte o excesso de açúcar em TG no fígado (Donnelly et al, 2005) contribuindo para o estabelecimento da esteatose.

Estudos mostraram que o acúmulo intracelular de lipídios dentro dos hepatócitos pode ativar macrófagos residentes, como as células Kupffer, que liberam citocinas pró-

inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Anderson & Borlak, 2008; Schindhelm et al, 2007; Szabo & Csak, 2002) desencadeando a NASH. Por outro lado, alguns estudos ainda sugerem que a inflamação precede o quadro de esteatose hepática na NASH (Wolf et al, 2014; Zhao et al, 2015). Outros estudos apontam a importância do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (EROs) (Eccleston et al, 2011) e da peroxidação lipídica em pacientes portadores da esteatose hepática e NASH (TIREI O NOBILI; Irie et al, 2012).

A principal ação da insulina no fígado é restringir a produção endógena de glicose, enquanto a taxa de captação de glicose é em grande parte independente da insulina (Yki-Järvinen, 2011). Em pacientes com esteatose hepática (Seppälä-Lindroos et al, 2002; Gastaldelli et al, 2007), a capacidade da insulina em inibir a produção de glicose está prejudicada, favorecendo a hiperglicemia e estimulando o pâncreas a secretar mais insulina. A hiperglicemia juntamente com hiperinsulinemia se correlacionam positivamente com o acúmulo de gordura no fígado, independentemente do IMC (Yki-Järvinen, 2014). O fígado de pacientes com esteatose hepática e/ou resistência à insulina aumenta a produção de VLDL (Fabbrini et al, 2008), por vezes levando a hipertrigliceridemia.

Em condições normais, a insulina diminui a produção de VLDL, tanto diminuindo o aporte de AGL para o fígado (inibição de lipólise do tecido adiposo), quanto por diminuir diretamente a produção de VLDL no fígado (Adiels et al, 2008). No entanto, em indivíduos portadores de esteatose hepática e/ou resistência à insulina, não ocorre inibição da produção de VLDL no fígado (Adiels et al, 2007). O aporte elevado de AGL para o fígado cronicamente pode saturar a capacidade hepática em secretar VLDL e contribuir para o agravamento da esteatose hepática. Por outro lado, Shindo e colaboradores (2010) mostraram que em um modelo poligenético de NAFLD, o camundongo shionogi, há um prejuízo na secreção de VLDL mesmo em dieta normal, o que contribui para o acúmulo de gordura no fígado, para o prejuízo da sinalização da insulina e para o estabelecimento da esteato-hepatite. Assim, fica claro que há uma relação recíproca entre a esteatose hepática e a resistência à insulina, criando um círculo vicioso entre os dois processos e agravando a NAFLD.

3. TRANSIDROGENASE DE NUCLEOTÍDEO DE NICOTINAMIDA (NNT)

A transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (NAD(P)-transidrogenase, EC 1.6.1.1, NNT) é uma enzima mitocondrial descoberta em 1952 por Colowick e

colaboradores. Neste estudo observaram a formação de NADPH aliada à oxidação do NADH em extratos de bactérias *Pseudomonas fluorescens* e, em seguida, Kaplan e colaboradores (1953) observaram a atividade da NNT em preparações de membranas de mitocôndrias em diversos tecidos, principalmente em coração (Rydstrom et al, 1976; Rydstrom, 1977; Humphrey, 1957). Em 1979, Rydstrom relacionou a atividade da NNT ao mecanismo de acoplamento quimiosmótico mitocondrial, no qual a energia resultante da força próton-motiva induz uma mudança conformacional da enzima reduzindo o NADP^+ . Clarke e Bragg (1985) inibiram a translocação de prótons pela NNT em *Escherichia coli* e observaram a inibição da transidrogenação. Assim, comprovaram que a translocação de prótons está relacionada à atividade catalítica desta enzima.

A enzima é um homodímero (Hoek & Rydström, 1988) e cada subunidade dessa proteína é composta por 3 domínios principais que são preservados em diferentes organismos: o primeiro domínio ou região C-terminal e o terceiro domínio ou região N-terminal são hidrofílicos e se encontram na matriz mitocondrial. Estes contêm sítios de ligação para o NADH e NADPH, respectivamente. O segundo domínio ou a região central é hidrofóbico e consiste de 14 hélices transmembranas que contém o canal de próton (Arkblad et al, 2002; Rydström et al, 1998; Leung et al, 2015). Além disso, Yamaguchi e colaboradores (1988) observaram que a NNT de bovinos possui uma sequência de 1043 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 109 kda.

Em condições fisiológicas, a NNT catalisa a transferência reversível do hidreto de NADH para NADP^+ de acordo com a reação: $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$ dependente do gradiente de prótons, deslocando o equilíbrio da reação no sentido da formação de NADPH (Earle et al, 1978; Pedersen et al, 2008; Rydström, 2006).

Estima-se que a NNT seja a fonte principal de NADPH na mitocôndria, e que representa até 45% do fornecimento de NADPH total da célula, sendo o restante resultante da via das pentoses-fosfato, isocitrato-desidrogenase (IDH2), enzima málica mitocondrial (ME) e glutamato desidrogenase (GDH) (Rydstrom, 2006; Sauer et al, 2004; Vogel et al, 1999, Yin et al, 2012). Por re-reduzir NADP a partir de NADH, a NNT é considerada o principal gerador de poder redutor do sistema enzimático antioxidante mitocondrial (Kowaltowski et al, 2001). Diminuição de NADPH causa diminuição da razão GSH/GSSG, tornando o ambiente mitocondrial mais susceptível a danos induzidos por espécies reativas de oxigênio (EROS) (Arkblad et al, 2005). *Caenorhabditis elegans* deficientes de NNT, através de mutações ou silenciamento por RNA de interferência (RNAi), mostraram-se mais sensíveis ao estresse oxidativo

(Arkblad et al., 2005). Silenciamento da NNT em células PC12 por RNAi resultou na redução dos níveis de NADPH celular, da razão GSH/GSSG e aumento nos níveis de H_2O_2 (Yin et al, 2012).

Em 2005, Toye e colaboradores mostraram que os camundongos C57BL/6J, oriundos do *Jackson Laboratory* em Bar Harbor, diferem de outras linhagens C57BL/6 por possuírem uma mutação espontânea no gene da NNT. É uma deleção que exclui 5 exons (7 ao 11) do gene da NNT, com estimativa de ocorrência no período entre 1976 e 1984, resultando em níveis extremamente baixos de sua expressão no fígado e pâncreas. Os autores propuseram que a deficiência desta enzima desencadeia um prejuízo na homeostase glicêmica, caracterizado por intolerância à glicose e secreção de insulina reduzida (Toye et al, 2005). De acordo com Freeman e colaboradores, a deleção do gene da NNT afetaria a produção de NADPH tornando o ambiente mitocondrial susceptível as EROS, ativando UCP2, reduzindo assim a síntese de ATP (Freeman et al, 2006). Fergusson e colaboradores (2014) estudaram duas linhagens independentes C57BL/6J (B6J) e C57BL/6N (B6N) e observaram que a mutação da NNT nos B6J prejudicou a secreção de insulina quando a glicose foi administrada por via intravenosa durante o teste de tolerância e clamp hiperglicêmico, mas não em resposta à glicose administrada por via oral. A primeira e segunda fase da secreção de insulina foram alteradas nos animais B6J (NNT mutada) em comparação aos B6N (NNT intacta), mas não encontraram alterações significativas na sensibilidade à insulina global, depuração de insulina, massa de células beta ou resposta central à glicose.

Em outro estudo sobre obesidade, foi verificado que os animais com NNT mutada apresentaram menor adiposidade (e hipoinsulinemia) em dieta com baixo teor de gordura (10%), porém desenvolveram maior adiposidade (e normoinsulinemia) em dieta rica em gordura (60%) (Nicholson et al, 2010).

Em mitocôndrias isoladas de fígado, Ronchi e colaboradores (2013) mostraram que a deleção da NNT resulta em anormalidades no estado redox mitocondrial indicando que, apesar da respiração mitocondrial de repouso e no estado de fosforilação serem similares nas mitocôndrias com e sem NNT, a capacidade antioxidante das mitocôndrias mutantes está significativamente comprometida e a produção de espécies reativas de oxigênio está aumentada. Em outro estudo desta vez com mitocôndrias isoladas de camundongos congênicos com e sem a mutação da NNT, Ronchi e colaboradores (2016) mostraram que, dependendo do substrato fornecido e do estado respiratório mitocondrial, a NNT pode contribuir de forma diferente para o metabolismo

de peróxido. A NNT no estado basal contribui com 60 e 100% na presença de piruvato/malato e glutamato/malato, respectivamente. Enquanto que, durante o estado de fosforilação oxidativa, a contribuição da NNT foi de 63% na presença de glutamato/malato. Isso ocorre porque há menor disponibilidade de NADH e de potencial eletroquímico de membrana e maior fluxo de substratos pelo ciclo de Krebs, disponibilizando mais substrato para a IDH2, e consequentemente regenerando mais NADPH por esta via (Ronchi et al, 2016).

Estudo em humanos mostrou que a mutação do gene da NNT está associada com deficiência de glicocorticóides familiar (Meimaridou et al, 2012). Esta deficiência também conhecida como síndrome da resistência ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) é recessiva e autossômica (Clark et al, 1993). Os portadores desta síndrome apresentam quadro de hipoglicemia severa no período neonatal ou na infância, baixos níveis de cortisol, altos níveis de ACTH (Clark et al, 1993). Meimaridou et al (2012) mostraram que a mutação espontânea da NNT nos camundongos C57BL/6J reduziu os níveis de corticosterona basal e estimulada por ACTH quando comparados aos camundongos C57BL/6N. Além disso, mostraram em células adrenocorticais de humanos, com deleção do gene NNT, um aumento significativo de espécies reativas de oxigênio (EROS), sugerindo que o estresse oxidativo compromete a via de esteroidogênese. Meimaridou e colaboradores (2018) investigaram quais os mecanismos poderiam estar envolvidos na deficiência de glicocorticóides. Para isso, analisaram adrenais de camundongos C57BL/6N (NNT intacta), C57BL/6J (NNT mutada) e C57BL/6JBAC (superexpressão da NNT) e observaram que tanto a deleção quanto a superexpressão da NNT reduzem a produção de esteróides da supra-renal por diminuir a expressão das enzimas antioxidantes mitocondriais (*Prdx3* e *Txnrd2*) e esteroidogênicas (*Cyp11a1*). Portanto, os distúrbios na homeostase redox adrenal são mediados pela baixa e também pela superexpressão da NNT.

Como trata-se de enzima mitocondrial essencial para o balanço redox da organela, acreditamos que sua deficiência pode comprometer outras funções bioenergéticas celulares e do organismo como um todo.

3.1. Importância de estudo em camundongos congênicos

A maior parte dos estudos sobre a NNT na literatura foi realizada em linhagens isogênicas independentes (C57BL/6J vs C3H/HeH, C57BL/6J vs C57BL/6N, etc). Todos os estudos revelam importantes alterações metabólicas as quais são atribuídas à

deficiência de NNT (Attané et al, 2016). No entanto, é impossível descartar a provável interferência de outras alterações genéticas (mutações e polimorfismos) nestes estudos.

Para que o efeito isolado da deficiência de NNT seja investigado é necessária a homogeneidade do background genético, isolando como única diferença genética, a mutação da NNT. Para tanto, foi necessário o desenvolvimento de linhagens congênicas, isto é, foi realizada a introdução da mutação da NNT em camundongos wild-type (C57BL/6JUnib) através de retrocruzamentos sucessivos de animais C57BL/6J com C57BL/6JUnib até a sétima geração, o que permite a obtenção de 99,2% de homogenização do background genético nos descendentes, exceto pela presença da mutação da NNT.

É importante chamar a atenção para o extenso uso de camundongos C57BL/6J em estudos biomédicos, e especialmente sobre o metabolismo e patofisiologia mitocondrial (Figueira, 2013). Esses camundongos são ainda muito utilizados para geração de camundongos transgênicos e knockouts para o estudo de muitos genes diferentes, sem a devida atenção as mutações de base. Embora a mutação da NNT nos camundongos C57BL/6J tenha ocorrido há três décadas no laboratório do Jackson, ela só foi descoberta em 2005. Em decorrência da mutação da NNT, os camundongos C57BL/6J apresentam prejuízos no estado redox mitocondrial e no metabolismo de peróxido nas mitocôndrias gerando diversas controvérsias quando utilizados como animais controles em estudos de metabolismo e de bioenergética (Figueira, 2013).

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

C57BL/6J é uma linhagem de camundongos amplamente usada em pesquisas de metabolismo energético, inclusive para produção de animais geneticamente modificados. Os animais C57BL/6J provenientes do *Jackson Laboratory* diferem de outras linhagens C57BL6 por possuírem uma deleção natural em parte do gene da NNT que resulta em níveis extremamente baixos de expressão da enzima no fígado e pâncreas destes animais (Toye et al., 2005). Trabalhos anteriores mostraram que a mutação nessa enzima está associada a alterações do estado redox de mitocôndrias hepáticas (Ronchi, 2013, 2016; Navarro et al, 2017), redução de secreção de insulina (Freeman et al, 2006; Toye et al, 2005) e aumento de obesidade induzida por dieta (Nicholson et al, 2010) em animais C57BL/6J provenientes do Jackson Laboratory (B6-J) quando comparados a linhagens sem esta mutação (por exemplo, C57BL/6N).

Nossa hipótese é de que a deficiência de NNT causa estresse oxidativo em alguns tecidos, o que contribui para a gênese de distúrbios do metabolismo glicídico e lipídico que predispõe ao aparecimento de diabetes e obesidade.

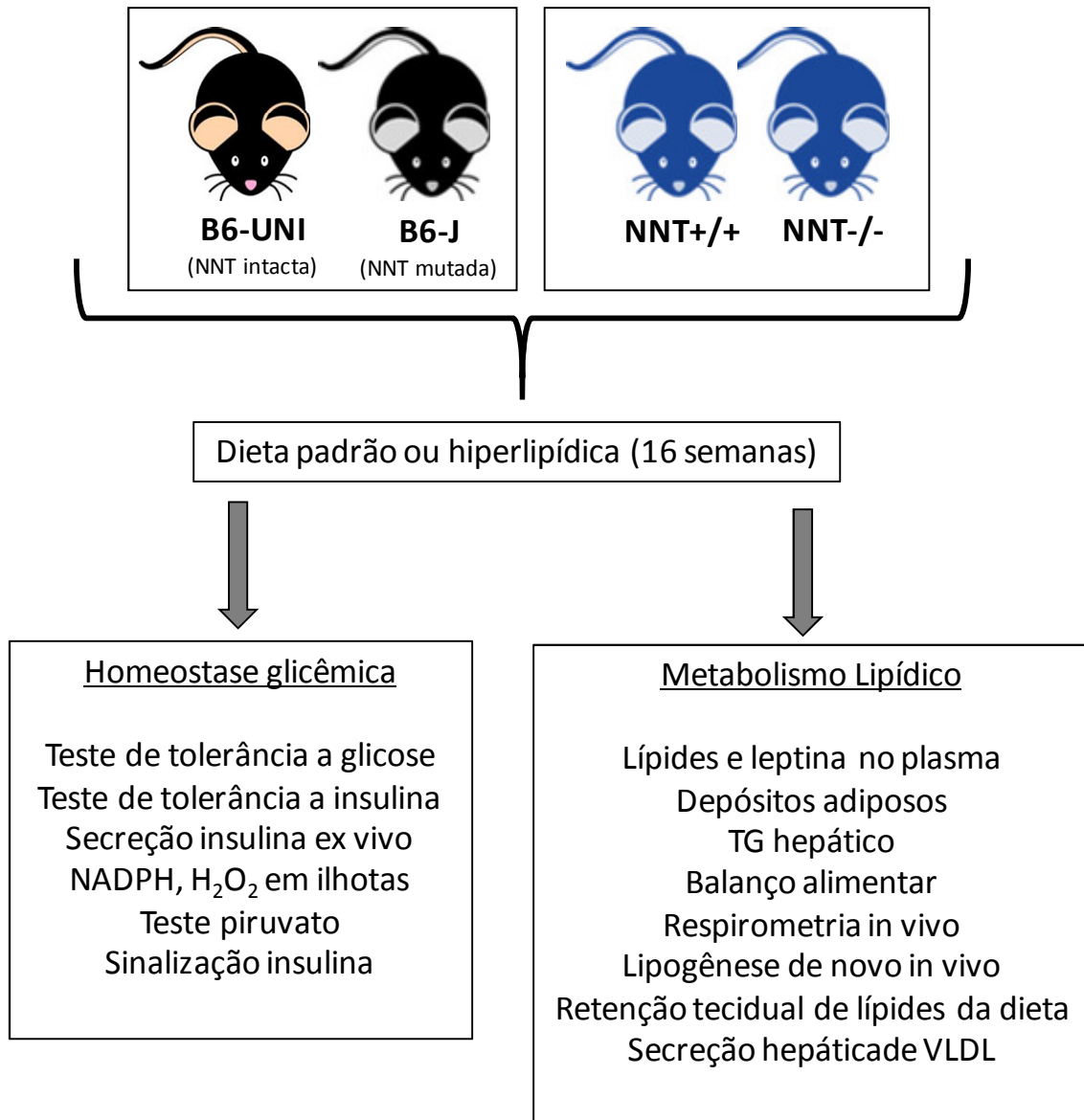
OBJETIVO GERAL

Investigar o metabolismo glicídico e lipídico visando entender o papel da enzima mitocondrial transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (NNT) na suscetibilidade ao diabetes e à obesidade. Para tanto, estudamos sub-linhagens C57BL6 isogênicas independentes, com e sem mutação da NNT, B6-J e B6-UNI, respectivamente, assim como linhagens congênicas (com >99% de homogeneidade de background genético) com e sem a mutação da NNT (NNT^{-/-} vs NNT^{+/+}).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar o papel da NNT sobre a homeostase glicêmica, através da determinação da tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, secreção de insulina estimulada com glicose em ilhotas pancreáticas isoladas, e sensibilidade hepática à insulina.
2. Investigar o papel da NNT sobre o acúmulo de gordura nos depósitos adiposos (lipogênese e retenção de lípidos) e hepático (lipogênese, retenção e secreção de lípidos), balanço alimentar e metabolismo corporal.

FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS



MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL6/JUnib (B6-UNI) machos oriundos do Centro multidisciplinar de Investigação Biológica em Animais de Laboratório (CEMIB/Unicamp, originalmente obtidos de Hannover em 1983) e camundongos C57BL6/J (B6-J) provenientes do *Jackson Laboratory* (stock number 000664, importados em 2009, Bar Harbor, ME), também mantidos no CEMIB, com 2 e 5 meses de idade, em dieta padrão ou dieta hiperlipídica. Além disso, foram desenvolvidas duas novas linhagens C57BL6 por retrocruzamentos da linhagem mutante da enzima NNT, B6-J, com a linhagem B6-Uni, por 7 gerações sucessivas para homogeneização do background genético (99,2%) (Ronchi et al, 2016), a partir de então estabeleceu-se as linhagens congênicas NNT+/+ e NNT-/- . Os protocolos experimentais foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/Unicamp (protocolo nº 3472-1). Os camundongos foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), luminosidade (ciclos de claro e escuro de 12 horas), recebendo água e ração (Nuvital CR1, Colombo, Brasil) *ad libitum*. Para experimentos terminais, a eutanásia foi realizada por aprofundamento anestésico com isoflurano, seguida de decapitação para coleta de sangue e órgãos.

Tratamento dietético

Camundongos com a NNT intacta e mutada com 1 mês de idade foram submetidos à dieta com alto teor de gordura (35 g% de gordura – dieta hiperlipídica - HF) e à dieta com baixo teor de gordura (4 g% de gordura – dieta padrão - Nuvital CR1, Colombo, Brasil) durante 4 meses. A dieta hiperlipídica é composta por 14% de proteína, 35% de gordura total (59% do valor energético total fornecido por lipídeos) e de 41% carboidratos.

Grupos e Estudos *in vivo*

- 1- B6-J (NNT mutada) vs B6-Uni (NNT intacta) em dieta padrão
- 2- B6-J (NNT mutada) vs B6-Uni (NNT intacta) em dieta hiperlipídica (HF, *high fat*)
- 3- NNT-/- vs NNT+/+ em dieta padrão
- 4- NNT-/- vs NNT+/+ em dieta hiperlipídica (HF, *high fat*)

Peso corporal e ganho ponderal

Os camundongos foram pesados 1 vez por semana durante 3 meses avaliando-se o peso corporal e o ganho ponderal dos camundongos.

Teor de lipídios no fígado

Os lipídeos totais do fígado foram extraídos utilizando o método de Folch (1957). Resumidamente, cerca de 60 mg de fígado foram homogeneizados em 1 mL de metanol e 2 mL de clorofórmio, deixados em repouso durante a noite. O extrato total obtido foi filtrado e seco em capela de exaustão. O extrato lipídico seco foi dissolvido em 500 µL de tampão contendo triton (0,5 M de KH_2PO_4 , 0,25 M de NaCl, 25 mM de ácido cólico e 0,5% de triton X-100, pH=7,4) e submetido as reações enzimáticas-colorimétricas para determinação das concentrações de colesterol e triglicérides através de kits da Roche- Hitachi® (Alemanha), conforme instruções do fabricante.

Calorimetria indireta (Respirometria)

A respirometria foi feita em equipamento Oxylet System (Panlab e Harvard Apparatus). Os camundongos foram aclimatados por 24 horas, e em seguida suas medidas foram avaliadas durante 24 horas. O software metabolism v2.2.01 forneceu os valores de consumo de oxigênio (VO_2), produção de dióxido de carbono produzido (VCO_2), quociente respiratório (RQ) e gasto energético (EE). Os resultados foram normalizados pela massa corporal dos animais. Esta normalização é crítica para a análise e, embora massas magra e gorda não contribuam da mesma forma para o consumo de oxigênio (Butler & Kozak, 2010), ambas são importantes para a sua determinação (Kaiyala et al, 2010). Neste trabalho optou-se pela normalização por peso corporal, uma vez que se pretendia determinar o consumo de oxigênio do animal como um todo e não apenas de sua massa magra.

Avaliação da lipemia e glicemia

As amostras de sangue dos camundongos foram coletadas pelo plexo retro-orbital com auxílio de capilares heparinizados, centrifugadas a 1200 g por 15 minutos a 4°C. O colesterol total (COL) e triglicérides (TG) foram dosados no plasma dos camundongos em jejum (12h), utilizando-se kits enzimáticos colorimétricos da Roche-Hitachi® (Alemanha). As concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (AGL) foram mensuradas após jejum (12h), utilizando-se kit enzimático colorimétrico da Wako chemical (USA). Os níveis de glicose em jejum (12h) e em estado alimentado

foram medidos com auxílio de glicosímetro (Roche- Accu-Chek, Suíça) através da coleta de sangue caudal.

Avaliação das concentrações plasmáticas de insulina, leptina, adiponectina e peptídeo C

As amostras de sangue dos camundongos foram coletadas com o auxílio de capilares heparinizados, centrifugadas a 1200 g por 15 minutos a 4°C. A insulina, leptina e peptídeo C foram dosadas em plasma usando kits de Elisa (Crystal Chem High Performance Assays, IL, USA), conforme instruções do fabricante. Os níveis de adiponectina foram mensurados em plasma usando kit de Elisa (Millipore, Billerica, MA, USA).

Teste de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT)

Os camundongos foram mantidos em jejum por 12 horas e uma amostra de sangue basal foi colhida da ponta da cauda (tempo = 0 min). Em seguida, os animais receberam por via oral (gavagem) uma carga de glicose de 1,5 g/Kg de peso corporal e coletas sanguíneas subsequentes foram realizadas nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos (Merat et al, 1999) para a mensuração da glicose com glicosímetro (Roche- Accu-Chek, Suíça). Para o teste de tolerância à insulina (ITT), os camundongos foram submetidos a jejum de 12 horas, seguido de um período de 2 horas com ração antes do teste. Uma amostra de sangue basal foi colhida da ponta da cauda (tempo = 0 min). A carga de insulina humana (BiohulinOR, Biobrás, Brasil) de 0,75 U/kg de peso corporal foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue adicionais foram coletadas em tempos subsequentes determinados (0 a 60 minutos) para a mensuração da glicose em glicosímetro (Roche- Accu-Chek, Suíça).

Produção de glicose hepática a partir do piruvato

Os camundongos foram mantidos em jejum por 16 horas e uma amostra de sangue basal foi colhida da ponta da cauda (tempo = 0 min). Em seguida, os animais receberam por via oral (gavagem) uma carga de piruvato de 1,5 g/Kg de peso corporal e coletas sanguíneas subsequentes foram realizadas nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos para a mensuração da glicose com glicosímetro (Roche- Accu-Chek, Suíça), conforme as instruções do fabricante.

Avaliação da massa corporal e tecidual

Os camundongos foram mortos por aprofundamento anestésico com isoflorano e decapitação em estado de jejum e, em seguida, foram coletados o fígado, músculo e os tecidos adiposos (perigonadal, subcutâneo e marrom) dos camundongos e suas respectivas massas determinadas por gravimetria.

Balanço alimentar (ingestão vs excreção):

Os animais foram alocados individualmente nas gaiolas e tiveram a quantidade de dieta ingerida e a excreção fecal pesados após 24 horas. A gordura de alíquotas da dieta e das fezes foi extraída pelo método de Folch (1957) e o extrato seco pesado em balança de precisão.

Lipogênese *in vivo*

Os camundongos foram pesados e receberam intraperitonalmente 20 mCi de água triciada diluída em solução salina 0,85%. Após uma hora, os animais foram anestesiados por aprofundamento anestésico com isoflurano e tiveram a coleta de sangue por decaptação da cabeça. O plasma foi obtido para determinação da radioatividade (20 µL) em contador Beta e os tecidos (fígado, tecido adiposo subcutâneo e perigonadal) foram coletados e pesados. Os lipídeos das amostras de tecidos foram extraídos de acordo com o protocolo de Folch (1957). O extrato seco foi redissolvido em 3 mL da solução cintiladora para contagem de sua radioatividade.

Retenção de ácidos graxos pelo fígado, tecido adiposo e músculo (*in vivo*)

Após 8 horas de jejum, os animais receberam trioleína marcada com trício (3H TO) dissolvida em óleo vegetal (5 uCi e 180 mg/animal) por via oral. Vinte e quatro horas depois da administração orogástrica, os animais foram anestesiados e sacrificados por exsanguinação total para coleta dos tecidos (fígado, músculo gastrocnêmio e depósitos adiposos perigonadal, subcutâneo e marrom). Os tecidos (100 a 500 mg) foram usados para extração da gordura por Folch (1957). Após a evaporação do solvente foram adicionados 3 ml de líquido de cintilação para amostras não aquosas (GE Healthcare-Amersham) para contagem da radiação ionizante em contador beta (Bekmam - LS 6000TA).

Secreção de VLDL-TG

Após 12 h de jejum, amostras de sangue basal foram coletadas através da ponta da cauda ($t = 0$ min) dos camundongos. Os camundongos receberam uma injeção IP de Triton WR 1339 (500 mg / kg em solução salina; Sigma) para inibir a atividade da lipoproteína lipase que hidrolisa TG e a depuração de TG. As amostras de sangue foram coletadas aos 120 e 150 minutos após injeção Triton e centrifugadas a 1200 g 4°C e 15 minutos. Para análise da velocidade de secreção de VLDL-TG, os níveis plasmáticos de TG foram determinados usando um ensaio enzimático-colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Chod-Pap; Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemanha).

Isolamento de ilhotas pancreáticas e secreção de insulina

Os camundongos foram mortos por decapitação e, após incisão abdominal, o ducto pancreático foi exposto e obstruído para evitar a saída de solução de collagenase para o duodeno. Na porção distal do ducto biliar comum foi realizada uma pequena incisão no ducto para introduzir uma agulha de insulina pela qual foi injetado no pâncreas 2 a 3 ml de solução de Hanks com collagenase tipo V (0,8 mg/ml; Sigma). O pâncreas foi retirado da cavidade abdominal por dissecação e transferido para um tubo de 15 ml, o qual foi incubado em banho a 37° C durante 10 min. Ao final deste período foi realizada uma pequena agitação de 30 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida mediante a adição de Hanks a 4°C. O material foi centrifugado com solução de Hanks 4 vezes para a remoção da collagenase e enzimas digestivas liberadas durante a incubação. As ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com o auxílio de pipeta Pasteur, previamente estirada e siliconizada. Em seguida, as ilhotas dos grupos estudados foram transferidas para placas de cultura com 24 poços (5 ilhotas/poço) contendo 1 mL de solução de Krebs suplementada com 0,1% de BSA (m/v) na presença de 2,8 mM de glicose, pH 7,4. As placas foram acondicionadas a 37°C, e mantidas em ambiente umidificado e gaseificado com 95% O₂/5% CO₂ por 30 min. Após este período a solução foi removida e as ilhotas foram novamente incubadas por 7 minutos e 1 hora com nova solução contendo 2,8 mM ou 16,7 mM de glicose. Parte do meio de incubação foi removido e armazenado em tubo de ensaio à -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (RIE).

Radioimunoensaio para insulina

A secreção de insulina foi quantificada no meio das ilhotas pelo método de radioimunoensaio (Scott et al, 1981), utilizando-se anticorpo específico para insulina de rato para traçar a curva padrão e insulina recombinante humana marcada com Iodo¹²⁵ (Perkin Elmer). As amostras foram lidas em contador de radiação gama (Automatic Gamma Counter - Perkin Elmer).

Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em ilhotas pancreáticas

A produção de H₂O₂ em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos foi mensurada com o reagente Amplex® Ultra Red (Invitrogen, Molecular Probes) na presença de HRP (horseradish peroxidase), na presença de glicose (16.7 e 22.8 mM). O ensaio foi realizado na presença e ausência de catalase (500 U/ml) por 1 hora e a fluorescência do produto oxidado (resorufina) por H₂O₂ foi mensurada ao longo do tempo em SpectraMax Microplate Reader (Molecular Devices) usando excitação e emissão com comprimentos de ondas 560 e 590 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos como a diferença (delta) de fluorescência nos tempos de 60 e 40 minutos.

Autofluorescência do NAD(P)H em ilhotas pancreáticas isoladas

Para estimar o conteúdo de NAD(P)H, ilhotas pancreáticas foram incubadas em 2 ml de Krebs, contendo 5,6 mM de glicose durante 1h em estufa gaseificada com 95% O₂/5%CO₂ a 37°C. As ilhotas foram então colocadas em uma câmara de perfusão em presença de solução de Krebs contendo diferentes concentrações de glicose (2,8; 16,7 e 22,2 mM) usando um microscópio de fluorescência invertida (Nikon eclipse TE200). As imagens foram adquiridas com a câmera digital (PCO, Typ SensiCam, Alemanha) usando filtros na faixa de 10 nm (Omega Optics, Madri, Espanha). Os registros das oscilações da fluorescência de NAD(P)H foram realizados após ondas excitatórias de 365 nm selecionadas por uma luz de xenônio e a emissão captada a 510 nm. As imagens foram adquiridas a cada 60 segundos usando o software ImageMaster Ratio Imaging System version 5.0.

Sinalização de insulina

Os camundongos foram submetidos ao jejum durante a noite e receberam uma injeção intraperitoneal de 0,1 U de insulina ou volume equivalente de saline. Os animais foram anestesiados por aprofundamento anestésico com isoflurano. Após 5 minutos, o

fígado e músculo foram coletados e homogeneizados em tampão (Tris pH 7,5 100 mmol/L, pirofosfato de sódio 10 mmol/L, fluoreto de sódio 100 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, vanadato de sódio 10 mmol/L, PMSF 2 mmol/L and Triton X-100 1%) por 20 segundos. Homogenatos foram agitados suavemente por 1 h a 4°C e centrifugados (14000 g for 30 min) a 4°C. O conteúdo de proteína dos lisados foi determinado pelo método de Bradford. Após rápida fervura, foram aplicados em gel de poliacrilamida (10%) para separação de proteínas por eletroforese. As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, em aparelho de transferência da BIO-RAD. Ligações não específicas foram inibidas por meio da pré-incubação da membrana com tampão de bloqueio (5% de BSA) durante 1 hora e meia. A membrana bloqueada foi incubada overnight com anticorpo primário anti-phospho Akt (Threonine308) (SC-16646-R, Santa Cruz, CA, USA), anti-Akt (9272-S, Cell Signaling Technology, USA) e anti-tubulina (T6074, Sigma). Seguiu-se 1 hora de incubação com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase horseradish. (1:10000, Invitrogen, São Paulo, SP, BRA). A detecção foi realizada por quimioluminescência através do fotodocumentador (Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences), As intensidades das bandas foram quantificadas com o software Image J.

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ ep (erro padrão). As comparações dos dados entre dois grupos foram analisadas por Test T de Student dentro de cada condição experimental (dieta padrão ou dieta hiperlipídica). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Os testes foram realizados usando o software Graph Pad Prism 5. Não foi objetivo deste estudo comparar as duas condições de dieta (padrão vs hiperlipídica). No caso de comparação de mais de 2 grupos (experimento com tratamento com TEMPOL) foi utilizada a Anova Two-Way.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 1

Efeito da mutação da NNT no metabolismo glicídico

Estudos em linhagens independentes B6-J (mutante da NNT) e B6-UNI (NNT intacta)

Na **Tabela 1** apresentamos os dados de glicemia e insulinemia dos animais B6-J e B6-UNI em jejum e alimentados, na vigência de dieta padrão ou dieta hiperlipídica. Observamos aumento de insulinemia de jejum em dieta normal e aumento de glicemia de jejum em dieta hiperlipídica, sugerindo distúrbios da homeostase glicêmica. Em seguida, através do teste de tolerância à glicose (GTT) (**Figura 1A**), observamos que os camundongos mutantes B6-J, após uma sobrecarga oral de glicose (1,5 g/kg) apresentaram aumento na área sob a curva glicêmica de 28% quando comparados aos camundongos B6-UNI. Esse resultado mostrou que os animais mutantes são intolerantes à glicose. Avaliamos também os níveis plasmáticos de insulina e peptídeo C durante o GTT (**Figura 1 B, C**). Embora não se tenha observado alteração nos níveis de insulina, os níveis de peptídeo C (melhor indicador do processo de secreção de insulina) estavam significativamente reduzidos nos animais mutantes B6-J. Esses dados sugerem que a intolerância à glicose poderia ser explicada por deficiência na secreção de insulina. A homeostase glicêmica nos animais B6-J e B6-UNI também foi avaliada em animais alimentados com dieta HF (**Figura 1D e E**). Os camundongos mutantes B6-J alimentados com dieta HF tiveram um aumento de 36% nas áreas sob as curvas glicêmicas após a dose oral de glicose (**Figura 1D**) quando comparados aos camundongos B6-UNI. Observamos que a dieta HF piorou a intolerância à glicose em ambos os grupos, B6-J e B6-UNI, comparando o pico de glicose durante o GTT que é maior na dieta HF (308 e 407 mg/dl) que na dieta chow (240 e 288 mg/dl). Ainda, as linhagens independentes não apresentaram diferenças significativas nos níveis plasmáticos de insulina durante o GTT (**Figura 1E**).

Sabe-se que a intolerância à glicose pode ser explicada tanto por uma deficiência da função pancreática em secretar insulina quanto pela resistência periférica à ação da insulina (Prentki & Nolan; 2006). Assim, realizamos experimentos de secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas (**Figura 2**). Observamos que as ilhotas dos animais mutantes B6-J têm secreção de insulina significativamente reduzida (61%) na

condição de estimulação com glicose (16,7 mM) tanto em dieta padrão (**Figura 2A**), como em dieta HF (**Figura 2B**).

Na tentativa de explicar a redução de secreção de insulina estimulada por glicose, estudamos a produção de NAD(P)H nas ilhotas após estimulação com glicose 16,7 mM (**Figura 3**), a qual além de ser indicativa de atividade metabólica celular, também é o produto da reação catalisada pela NNT. Observamos que houve uma redução de 40% na área sob a curva de autofluorescência de NAD(P)H nas ilhotas dos animais mutantes B6-J (**Figura 3A-B**) em dieta padrão e de 50% da área sob a curva quando alimentados com dieta HF (**Figura 3C-D**). Esses resultados sugerem que os animais mutantes da NNT (B6-J) apresentam uma menor metabolização da glicose ou menor viabilidade celular.

É sabido que as ilhotas pancreáticas possuem poucas defesas antioxidantes (Lenzen, 2008). O estudo de Arkblad et al (2002) mostra que a NNT é altamente expressa em pâncreas. Assim, sua deficiência poderia aumentar ainda mais a suscetibilidade das células beta a um estresse oxidativo. Sabe-se ainda que em condições fisiológicas os níveis de espécies reativas de oxigênio de origem mitocondrial são sinalizadores celulares, porém em altas concentrações, as espécies reativas de oxigênio apresentam efeitos tóxicos para a célula (Rhee, 2006; Schieber & Chandel; 2014). Por esta razão, determinamos a liberação de H_2O_2 em ilhotas pancreáticas isoladas dos camundongos mutantes B6-J após estimulação com glicose (16,7 mM) (**Figura 4**). Verificou-se que a liberação de H_2O_2 foi maior nas ilhotas pancreáticas dos animais mutantes da NNT (B6-J) (**Figura 4A-B**) que exibiram um aumento significativo de 15% no período entre 40 a 60 minutos após o início da estimulação com glicose quando comparado aos animais B6-UNI sob dieta padrão. A especificidade do ensaio é obtida por descontar o sinal basal de fluorescência nas amostras com adição de catalase no meio de incubação das ilhotas. Em dieta HF, as ilhotas dos animais B6-J apresentam um aumento marcante de 9 vezes na taxa de liberação de peróxido de hidrogênio após estimulação com glicose em relação aos camundongos B6-UNI (**Figura 4C-D**).

Em seguida, avaliamos a sensibilidade periférica à insulina através do teste de tolerância à insulina (**Figura 5**), uma vez que, este é outro componente que pode afetar a tolerância à glicose. Observamos que após sobrecarga de insulina (0,75 U/kg), os animais B6-J apresentaram (**Figura 5A-C**) aumento de 30% na área sob a curva glicêmica e redução de 35% na velocidade inicial de decaimento da glicose (K_{ITT})

quando comparados aos camundongos B6-UNI sob dieta padrão. O mesmo ocorreu em dieta HF (**Figura 5D-E**), os animais B6-J apresentaram um aumento significativo de 31% nas áreas sob as curvas glicêmicas após injeção intraperitoneal de insulina e redução de 34% na velocidade inicial de decaimento da glicose quando comparados aos controles B6-UNI. Portanto, podemos concluir que os animais mutantes de NNT, B6-J, são intolerantes à glicose tanto por um defeito da secreção de insulina quanto por resistência periférica à insulina.

Para testar a resistência à insulina especificamente no fígado, realizamos o teste de produção de glicose a partir de piruvato, como medida da capacidade neoglicogênica do fígado (**Figura 6A-B**) que normalmente é inibida pela insulina. Verificamos que a área sob a curva glicêmica estava significativamente aumentada nos animais B6-J após dose oral (1,5 g/kg) de piruvato em relação aos B6-UNI. Para confirmar a resistência hepática à insulina instalada nos camundongos mutantes B6-J, investigamos diretamente a via de sinalização da insulina, determinando a expressão de AKT e sua fosforilação no fígado após estimulação com insulina (**Figura 7A-C**). Observamos uma redução significativa de 35% na fosforilação da proteína AKT (pAKT) (**Figura 7B**). Os níveis totais da proteína AKT não variaram entre as linhagens com ou sem insulina (**Figura 7C**). Esse dado corrobora com os resultados que mostraram um aumento significativo no processo de neoglicogênese nos camundongos mutantes B6-J.

Em resumo, os camundongos B6-J mutantes de NNT são intolerantes à glicose devido tanto ao prejuízo na secreção de insulina como na sensibilidade periférica à insulina. Porém, como as linhagens C57BL6 aqui estudadas são totalmente independentes, não podemos atribuir com certeza estas diferenças à mutação no gene da NNT, sendo possível que outras mutações estejam presentes e possam também interferir neste fenótipo. Assim, repetimos o estudo em linhagens congênicas desenvolvidas no laboratório dos Professores Anibal Vercesi e Roger Castilho, as quais tem 99,2% de homogeneidade de background genético (Ronchi et al, 2016).

Estudos nas linhagens congênicas NNT^{-/-} (mutante da NNT) vs NNT^{+/+} (NNT intacta)

Comparando as linhagens congênicas, observamos que os animais NNT^{-/-} em dieta padrão são de fato intolerantes à glicose, conforme demonstrado pelo aumento significativo da área sob a curva glicêmica do GTT (**Figura 8A**). Os níveis de insulina

(**Figura 8B**) e de peptídeo C (**Figura 8C**) durante o GTT foram semelhantes em ambos os grupos de camundongos com 5 meses de idade. Observamos ainda um aumento significativo de 20% na área sob a curva glicêmica do ITT e de 22% na velocidade inicial de decaimento da glicose nos camundongos NNT^{-/-} quando comparado aos camundongos NNT^{+/+} (**Figura 8D-F**), confirmando a resistência periférica à insulina nos animais mutantes em dieta padrão. Interessante que a intolerância à glicose já aparece nos animais mutantes de NNT (B6-J e NNT^{-/-}) aos 2 meses de idade, porém nesta idade, o teste de tolerância a insulina ainda é normal (**Figura suplementar 1**).

Quando os animais congênicos são desafiados com dieta HF, os mutantes NNT^{-/-} apresentaram uma maior intolerância à glicose, com aumento na área sob curva glicêmica de 40% em relação aos animais NNT^{+/+} (**Figura 9A**). No entanto, não verificamos diferenças significativas na sensibilidade periférica à insulina pelo ITT (**Figura 9B**).

Em seguida estudamos o efeito da mutação da NNT na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas (**Figura 10**). Diferentemente do observado nas linhagens independentes, não foi verificada alteração na secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais das colônias congênicas, seja em dieta padrão (**Figura 9A**) ou após dieta hiperlipídica (**Figura 9B**). Esses resultados indicam que, embora a NNT seja essencial para a homeostase glicêmica, sua falta por si só, não leva ao prejuízo na secreção de insulina. Coerentemente, as análises de autofluorescência do NAD(P)H (**Figura 11**) e de produção de peróxido de hidrogênio (**Figura 12**) em ilhotas pancreáticas isoladas e estimuladas com glicose foram semelhantes entre as linhagens congênicas, tanto em dieta padrão, quanto hiperlipídica, indicando funcionamento normal das ilhotas estimuladas com glicose, independente da mutação da NNT e da dieta.

Para caracterizar melhor a resistência periférica à insulina nos mutantes da NNT (NNT^{-/-}) realizamos o teste de conversão in vivo de piruvato em glicose. Verificamos que a área sob a curva glicêmica após sobrecarga de piruvato (1,5 g/kg) foi 32% maior nos animais NNT^{-/-} em relação aos animais NNT^{+/+} (**Figura 13**), indicando que a mutação da NNT de fato causa resistência à insulina no fígado. Para confirmar esse resultado, investigamos a sinalização da insulina via fosforilação da AKT (**Figura 14**). A fosforilação da AKT (pAKT) foi 36% menor nos animais NNT^{-/-} (**Figura 14A e B**). Os níveis de expressão da proteína AKT não variaram entre as linhagens congênicas com ou sem insulina (**Figura 14C**). Assim, semelhante ao observado nas linhagens

independentes, confirmou-se que a resistência periférica (hepática) à insulina está associada à mutação do gene da NNT.

Os possíveis mecanismos que poderiam conectar a deficiência da enzima mitocondrial NNT e a resistência à insulina nos tecidos alvos são listados abaixo:

- 1- Oxidação incompleta de ácidos graxos, aumento de diacilglicerol e ativação da PKC-epsilon que inibe a sinalização da insulina (Zhang et al, 2007);
- 2- Alterações na dinâmica mitocondrial, uma vez foi demonstrado que a inibição da fissão mitocondrial resolve a resistência à insulina (Jheng et al 2012);
- 3- Aumento de EROS mitocondrial que induz kinases de estresse aumentando a fosforilação em serina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) e consequentemente levando a resistência à insulina (Rudich et al 1998; Evans et al 2005; Dokken et al., 2008);
- 4- Aumento de EROS mitocondrial induzido por estresse de retículo, desencadeando inflamação e resistência à insulina (Boucher et al, 2014).

Neste contexto, apostamos na hipótese mecanística de que a falta da NNT nos tecidos alvos da insulina causa aumento de produção de EROS e causa prejuízo da sinalização da insulina. Para testar esta hipótese, tratamos os animais congênicos durante 1 mês com o antioxidante TEMPOL e verificamos que, de fato, este tratamento foi suficiente para corrigir a intolerância à glicose nos animais mutantes NNT-/- (**Figura 15**). O trabalho de Wang et al (2013) também dá suporte a esta hipótese. Esses autores induziram disfunção mitocondrial em linhagens de células adiposas (3T3-L1 diferenciadas) usando inibidores da cadeia respiratória (oligomicina A ou antimicina A) ou por knockdown do fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA), causando super-produção de EROS e atenuação da sinalização da insulina. Verificou-se nestas células com disfunção mitocondrial, a redução da captação da glicose, redução da fosforilação de AKT, e redução da expressão do GLUT-4 na membrana e da secreção de adiponectina (Wang et al, 2013). Além disso, a produção de oxidantes mitocondriais também tem sido implicada na cardiomiopatia diabética (Boudina et al, 2007; Dabkowski et al, 2009). Assim, verificou-se que o tratamento com antioxidante dirigido à mitocôndria (mito-TEMPO) em modelos de diabetes tipo 1 (estreptozotocina) e tipo 2 (camundongo db/db) inibiu a produção de EROS mitocondrial, preveniu o estresse oxidativo celular, diminuiu apoptose e reduziu a hipertrofia cardíaca nestes modelos (Ni et al, 2016).

Em conclusão, a deficiência de NNT causa intolerância à glicose por induzir resistência hepática à insulina, revertida por tratamento com antioxidante. Além disso, contrário dos dados da literatura, demonstramos que a deficiência de NNT não afeta a secreção de insulina estimulada por glicose. Provavelmente outras diferenças genéticas entre as linhagens C57BL6/J e C57BL6/JUnib são responsáveis pelo comprometimento da secreção de insulina estimulada por glicose nos animais C57BL6/J.

Tabela 1: Concentrações plasmáticas de glicose e insulina de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J).

		B6-UNI (NNT intacta)	B6-J (NNT mutada)
Dieta Padrão	Glicose (mg/dl)		
	Jejum	88,4 ± 5,41 (8)	88,5 ± 2,50 (8)
	Alimentado	162,7 ± 4,31 (6)	144,5 ± 7,07 (8)
	Insulina (ng/ml)		
	Jejum	0,24 ± 0,02 (12)	0,33 ± 0,03* (13)
	Alimentado	0,91 ± 0,11 (12)	0,85 ± 0,12 (12)
Dieta Hiperlipídica	Glicose (mg/dl)		
	Jejum	91,5 ± 5,55 (6)	136,9 ± 7,69* (7)
	Alimentado	179,0 ± 7,10 (6)	175,3 ± 6,58 (7)
	Insulina (ng/ml)		
	Jejum	1,9 ± 0,07 (11)	1,92 ± 0,08 (10)
	Alimentado	3,5 ± 0,46 (7)	2,7 ± 0,23 (11)

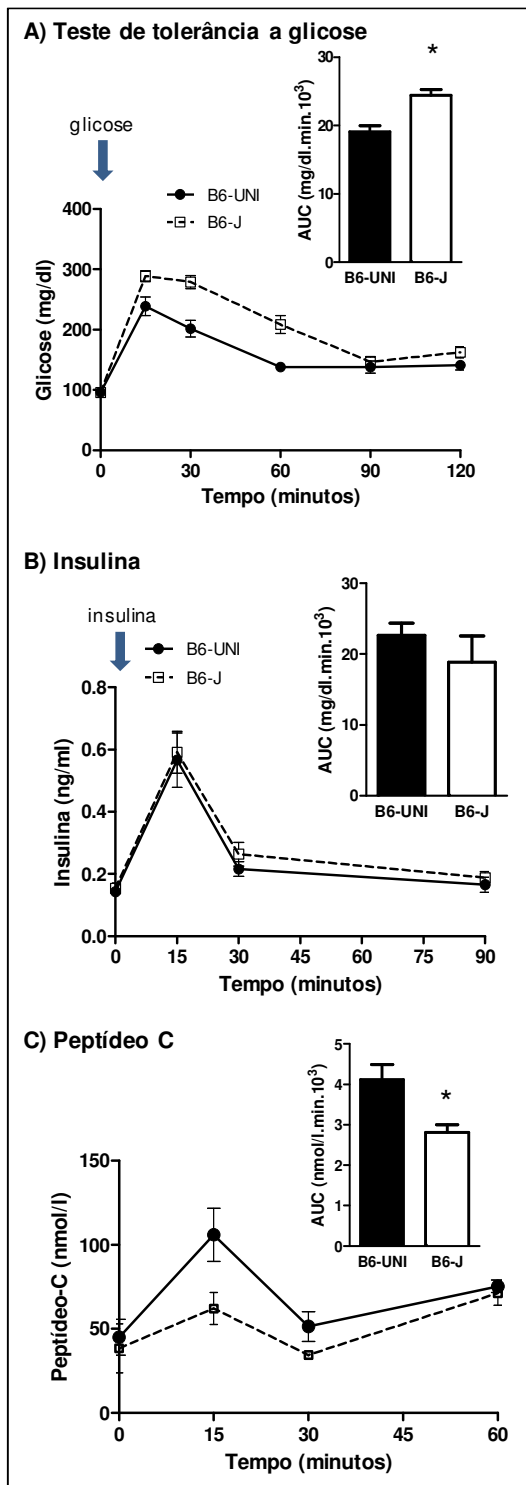
Média ± ep (n). Test T de Student; *p<0,05

Tabela 2: Concentrações plasmáticas de glicose e insulina de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-).

		NNT+/+ (NNT intacta)	NNT-/- (NNT mutada)
Dieta Padrão	Glicemia (mg/dl)		
	Jejum	74,8 ± 1,64 (6)	88,3 ± 4,03*
	Alimentado	144,8 ± 11,26 (6)	159,0 ± 5,65 (6)
	Insulina (ng/ml)		
	Jejum	0,4 ± 0,03 (4)	0,4 ± 0,04 (5)
	Alimentado	1,2 ± 0,10 (5)	1,3 ± 0,33 (6)
Dieta Hiperlipídica	Glicemia (mg/dl)		
	Jejum	68,7 ± 4,52 (5)	88,8 ± 5,63*
	Alimentado	155,5 ± 5,54 (5)	176,8 ± 6,75* (5)
	Insulina (ng/ml)		
	Jejum	1,56 ± 0,27 (5)	0,84 ± 0,2# (5)

Média ± ep (n). Test T de Student; *p<0,05.

DIETA PADRÃO



DIETA HIPERLIPÍDICA

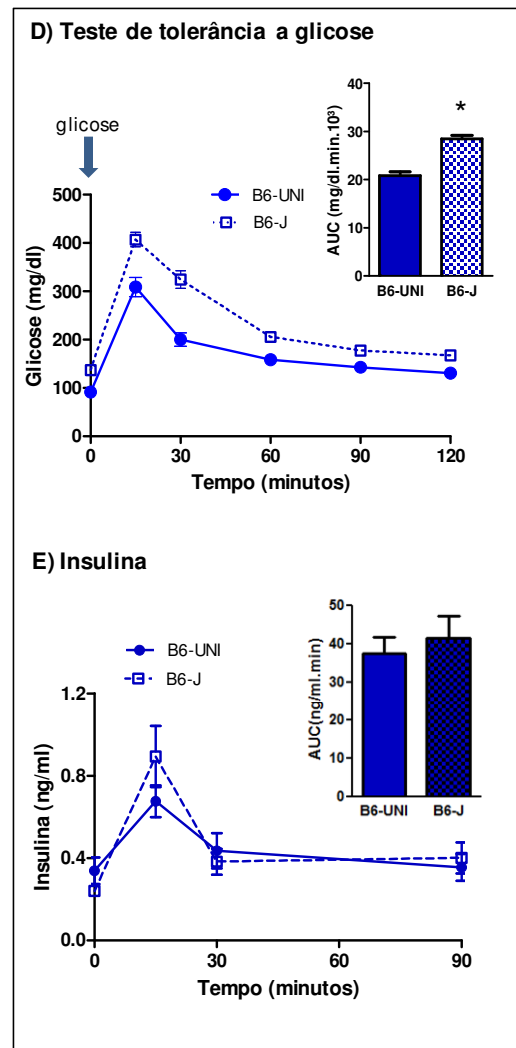
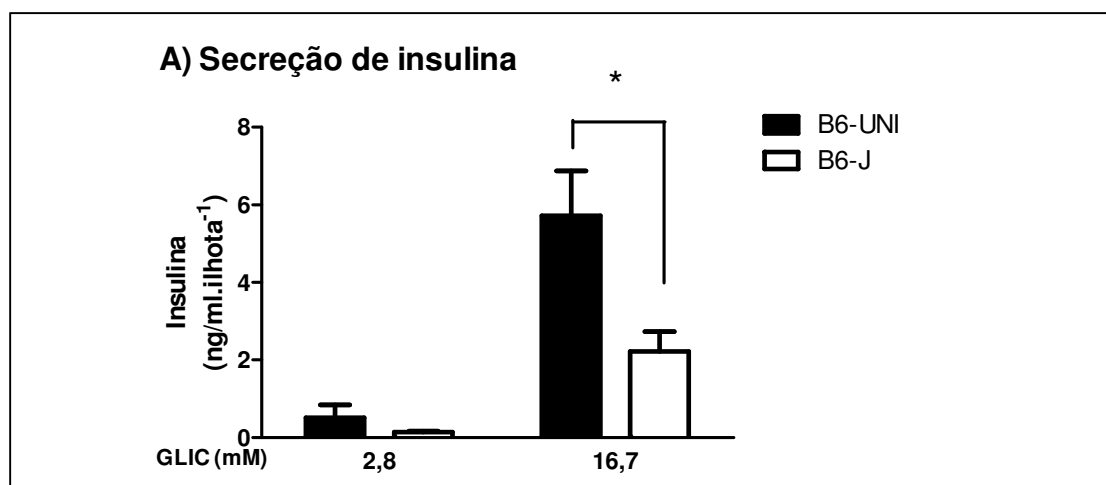


Figura 1: Teste de tolerância à glicose (GTT) (A, D), insulinemia durante o GTT (B, E) e peptídeo C (C) durante o GTT de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Painéis A-C sob dieta chow e painéis D-E sob dieta hiperlipídica. Média±ep (n=4-5 para painéis C e E, n= 6-7 para painéis A, B e D). Test T de Student: *p<0,05. Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

DIETA PADRÃO



DIETA HIPERLIPÍDICA

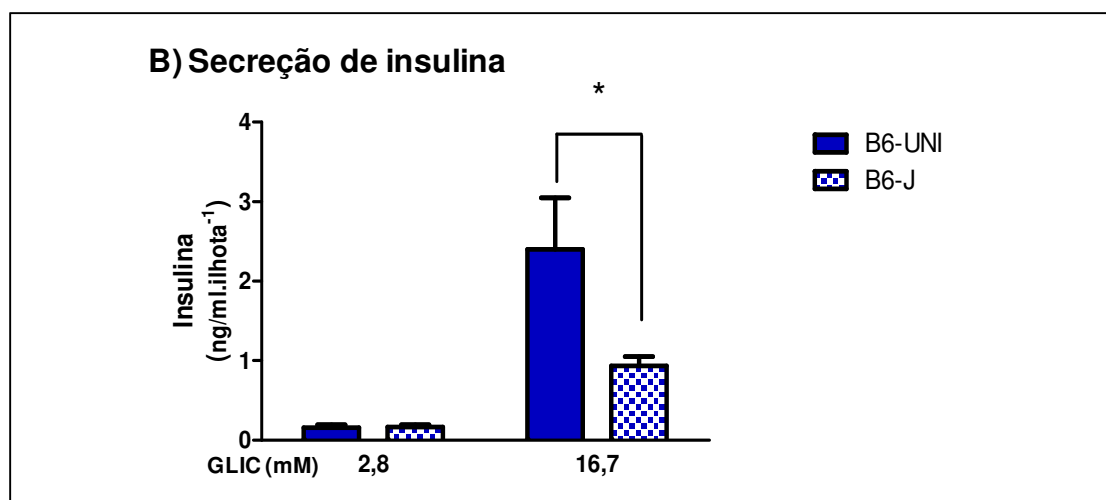
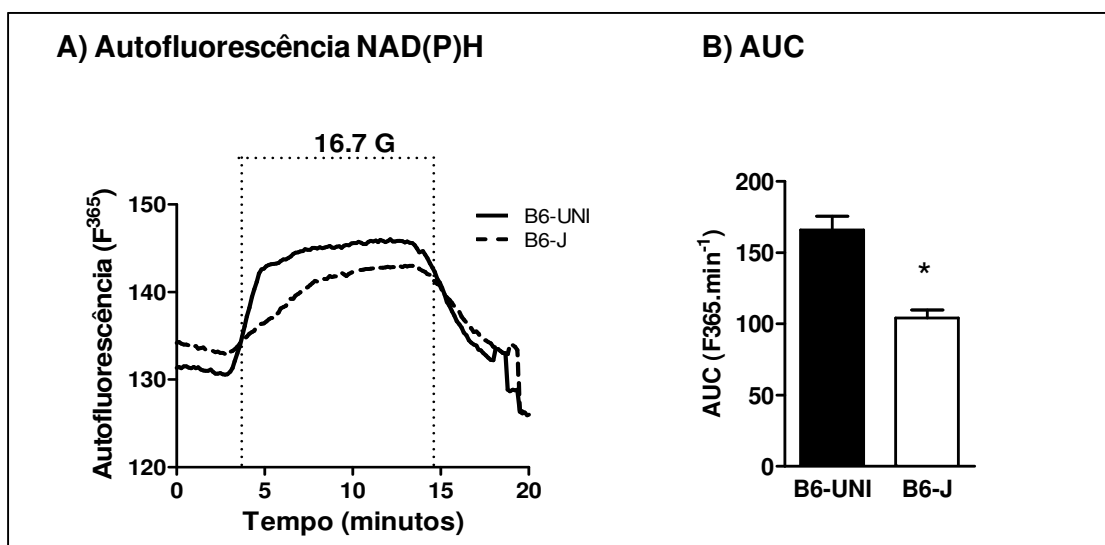


Figura 2: Secreção de insulina de 1 hora em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Paineis A e B sob dieta chow e dieta hiperlipídica. Média $\pm$ ep (n=7 animais para painel A, n=6-8 para painel B animais, sendo quadruplicatas por animal). Teste T de Student; *p<0,05. Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

DIETA PADRÃO



DIETA HIPERLIPÍDICA

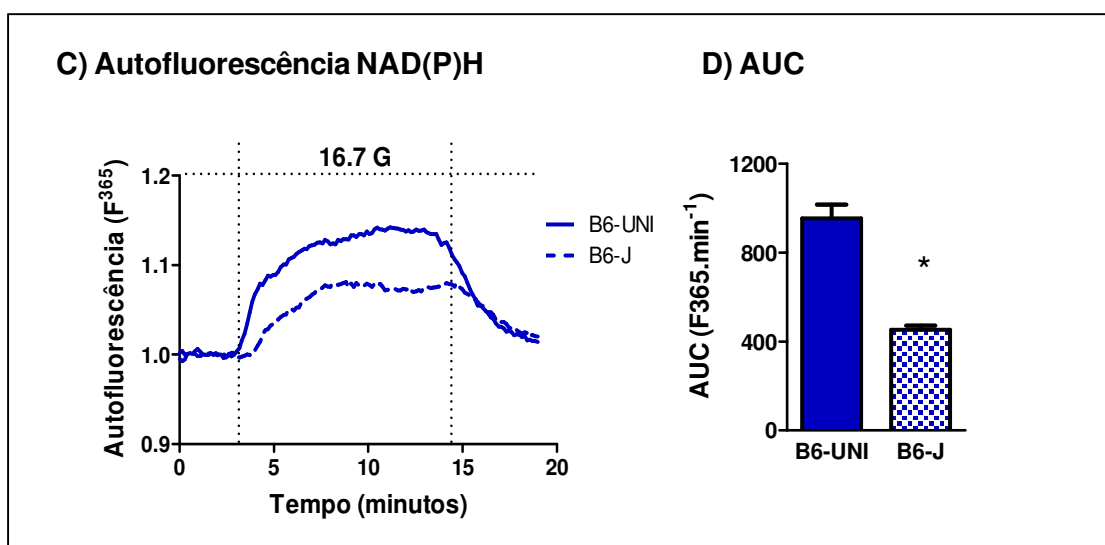
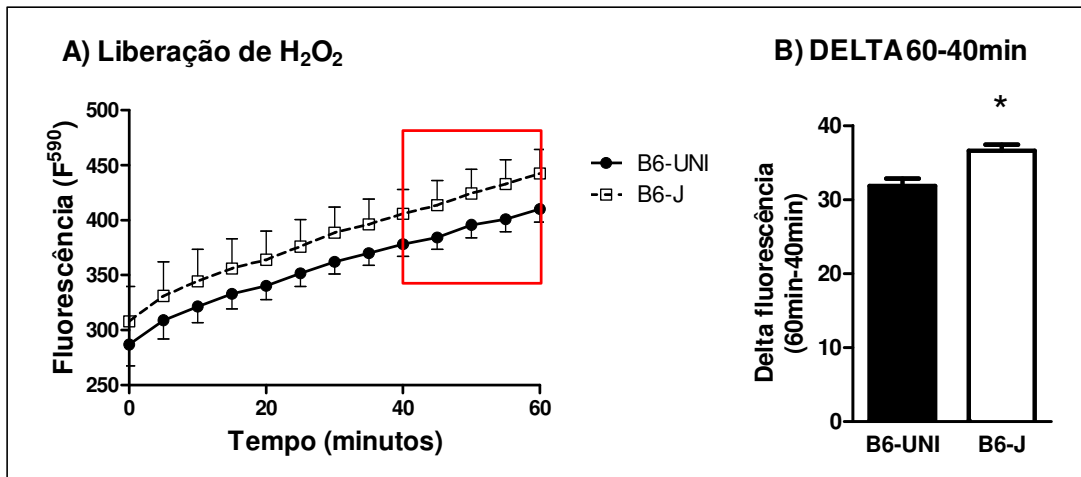


Figura 3: Autofluorescência de NAD(P)H em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em resposta à estimulação com glicose (16,7 mM). Painéis A-B animais sob dieta padrão e painéis C-D sob dieta hiperlipídica. Comprimento de onda excitação 365 nm e emissão 510 nm. Áreas sob as curvas (AUC) do painel A e C (B-D). Média $\pm$ ep ($n=7-10$ para painéis A-B, $n=4-5$ para painéis C-D). Test T de Student: * $p<0,05$. Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

DIETA PADRÃO



DIETA HIPERLIPÍDICA

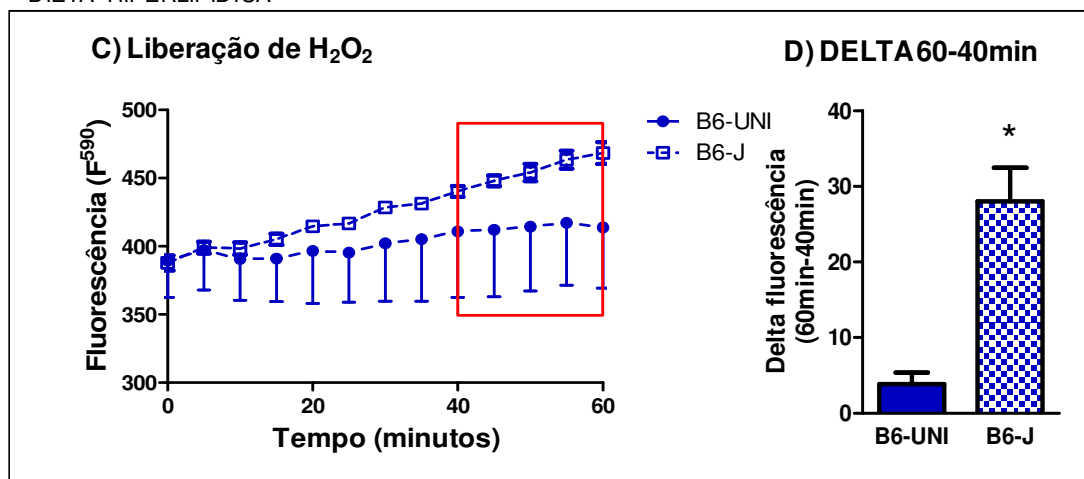
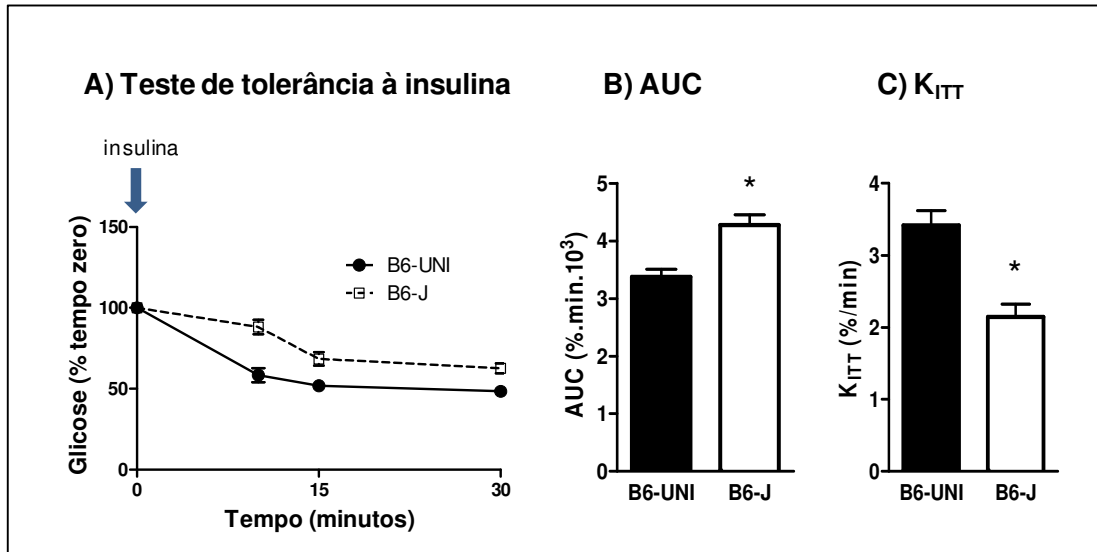


Figura 4: Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Amplex Ultra Red) em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Painéis A-B animais sob dieta padrão e painéis C-D sob dieta hiperlipídica. Curvas de fluorescência (A e C). Delta de fluorescência entre 60 a 40 minutos (B e D). Foram usados grupos de 25 ilhotas por animal estimuladas com 16,7 mM de glicose. Em paralelo, ilhotas incubadas com catalase (10000 U/ml) foram usadas para descontar background do sinal de fluorescência. Média $\pm$ ep (n=6-7 animais para painéis A e B, n=3-4 animais para painéis C e D, duplicatas ou triplicatas por animal). Test T de Student; * $p < 0,05$. Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

DIETA PADRÃO



DIETA HIPERLIPÍDICA

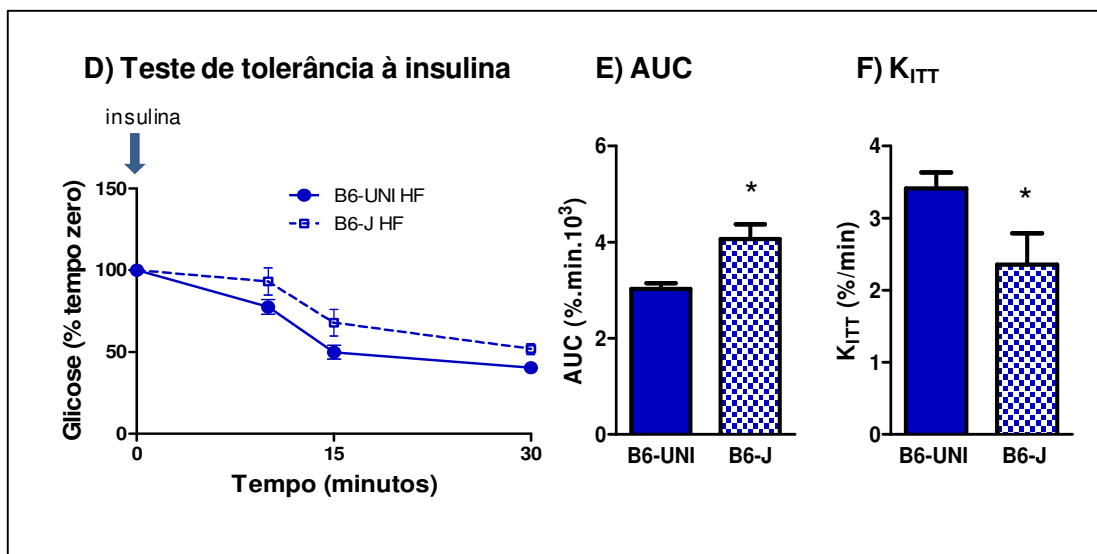
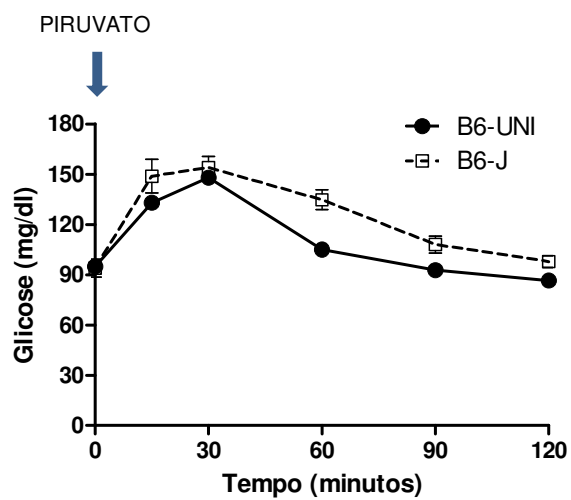


Figura 5: Teste de tolerância à insulina (ITT) de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-). Painéis A-C sob dieta padrão e painéis D-F sob dieta hiperlipídica. Curvas glicêmicas após dose intraperitoneal de insulina (0,75U/kg) (A e D). Áreas sob as curvas glicêmicas (AUC 0-30 minutos) (B e E). Velocidades de decaimento da glicose (K_{ITT} 0-15 minutos) (C e F). Média±ep (n=6-12 para A-C, n=12 para D-F). Test T de Student; *p<0,05.

A) Produção de glicose a partir de piruvato



B) AUC

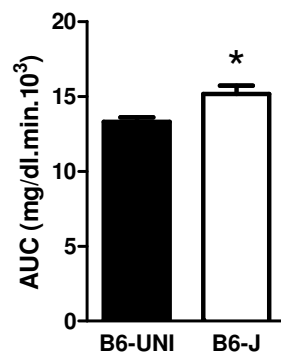
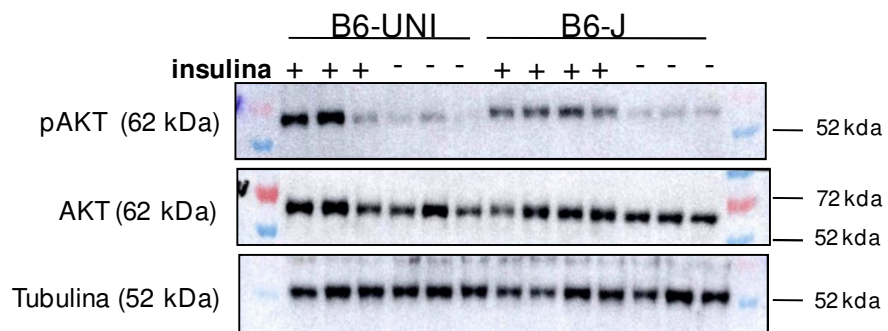
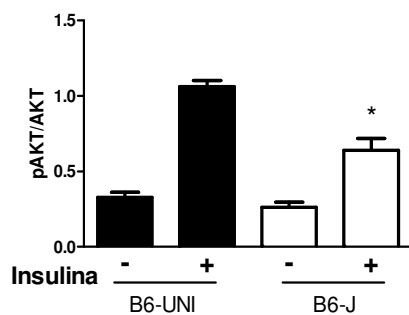


Figura 6: Produção de glicose hepática a partir do piruvato de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão. Curvas glicêmicas após dose oral de piruvato (1,5 g/kg) (A) e áreas sob as curvas glicêmicas (AUC 0-120 minutos) (B). Média $\pm$ ep (n=5-6). Test T de Student; *p<0,05.

A) Western Blot



B) pAKT/AKT



C) AKT /Tubulina

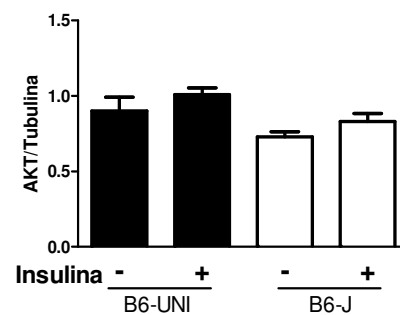


Figura 7: Sinalização da insulina em fígado. Expressão da Akt e sua fosforilação (Thr 308) em fígado de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão após 5 minutos de injeção ip de insulina (0,1 U/kg) ou salina. Imagens do Western Blot (A). Quantificação das imagens (B, C). Média $\pm$ ep (n=3-4). Test T de Student; *p<0,05.

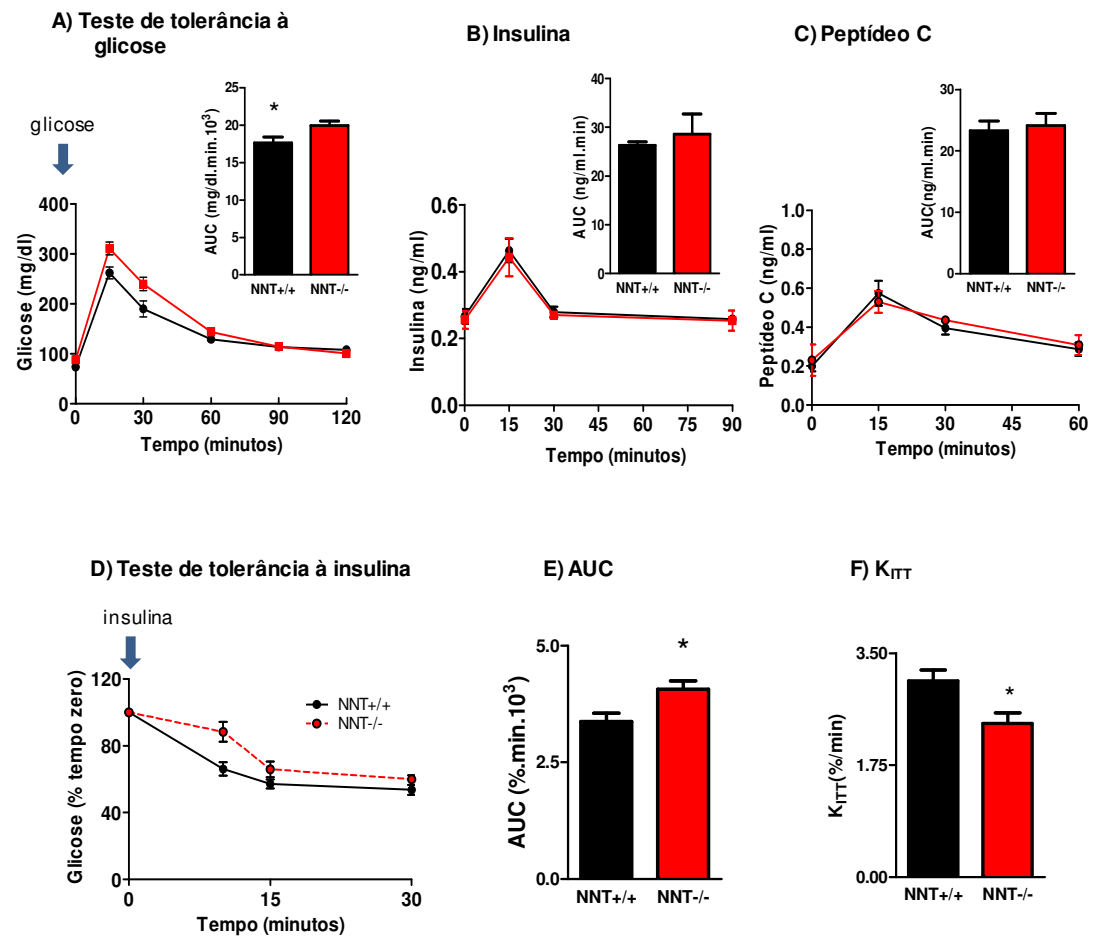
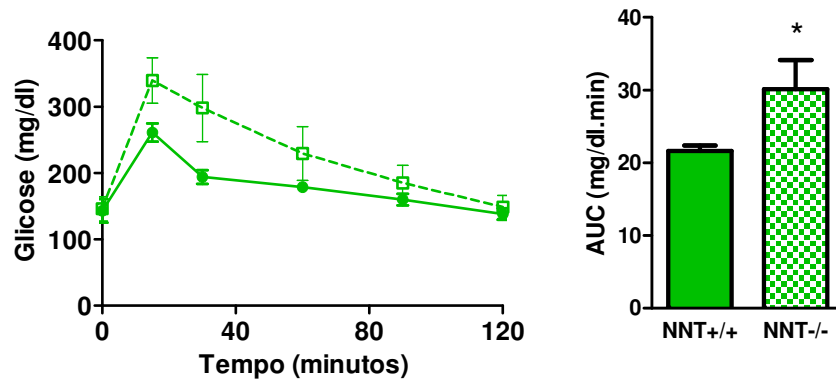


Figura 8: Homeostase glicêmica de camundongos congênicos C57BL/6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão. Curvas glicêmicas após dose oral de glicose (1,5 kg/g) e área sob as curvas (AUC) (A). Níveis de insulina durante o GTT e AUC (B). Concentrações de peptídeo C durante o GTT e AUC (C). Curvas glicêmicas após dose intraperitoneal de insulina (0,75U/kg) (D). AUC do painel D (0-30 minutos) (E). Velocidades de decaimento da glicose (K_{ITT}) do painel D (0-15 minutos) (F). Média±ep (n=6-7 para A, n=5-8 para B-C, n=8-9 para D-F). Test T de Student; *p<0,05.

A) Teste de tolerância à glicose



B) Teste de tolerância à insulina

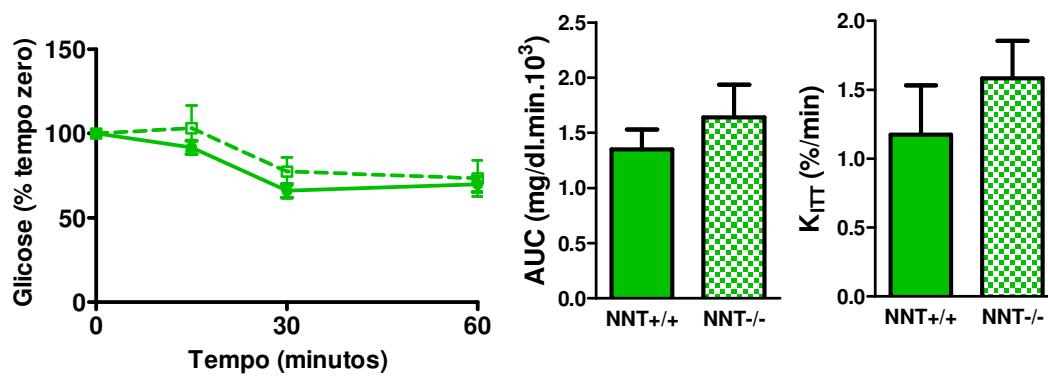
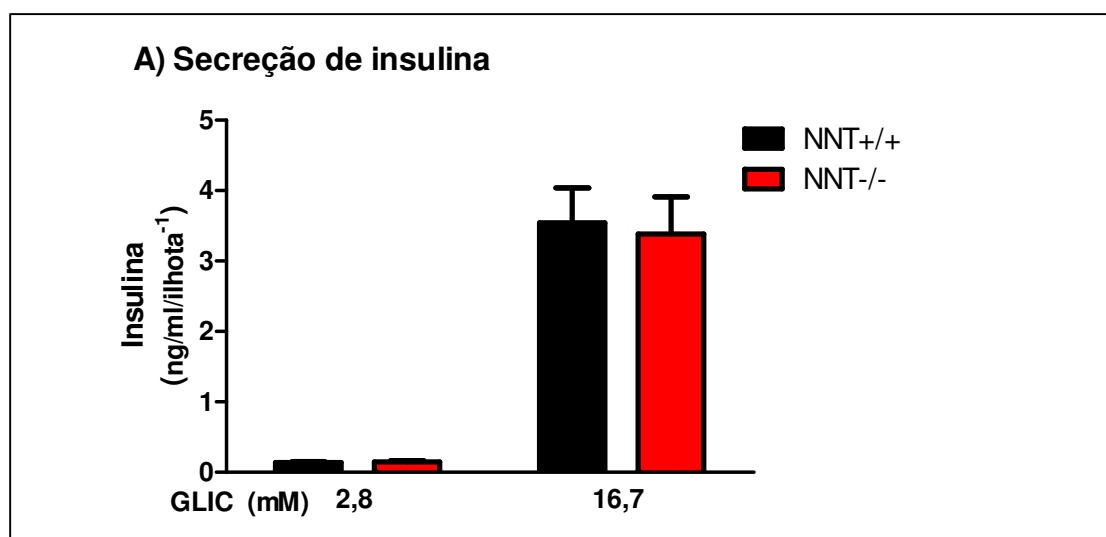


Figura 9: Homeostase glicêmica de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta hiperlipídica. Curvas glicêmicas após dose oral de glicose (1,5 g/kg) e AUC (A). Curvas glicêmicas após dose intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg) e AUC (0-30 minutos) e velocidades de decaimento da glicose (K_{ITT}) (0-15 minutos) (B). Média±ep (n=5 para A, n=9-11 para B). Test T de Student; *p<0,05. Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

DIETA PADRÃO



DIETA HIPERLIPÍDICA

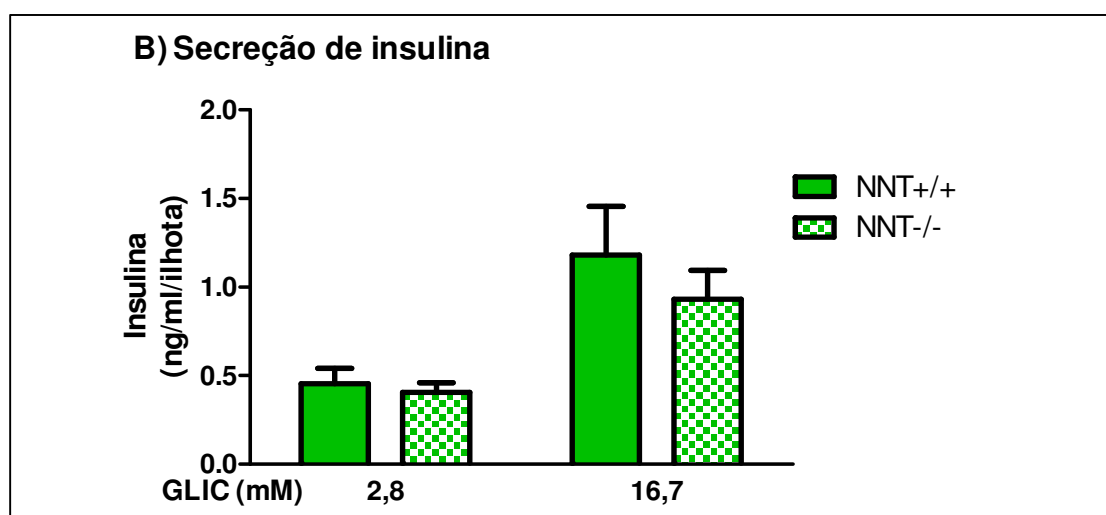
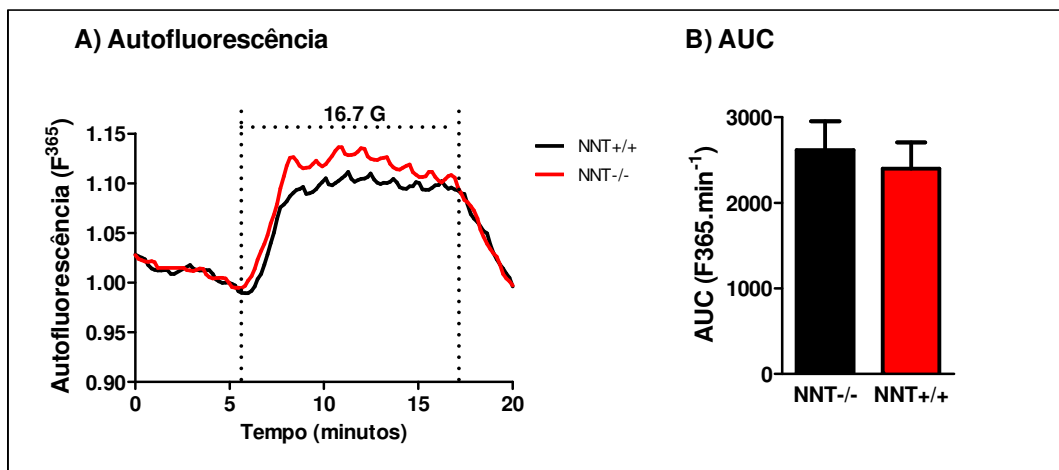


Figura 10: Secreção de insulina por 1 hora em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-). Painei A animais sob dieta padrão e painei B sob dieta hiperlipídica. Média $\pm$ ep (n=9-10 para A, n=6 para B). Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

DIETA PADRÃO



DIETA HIPERLIPÍDICA

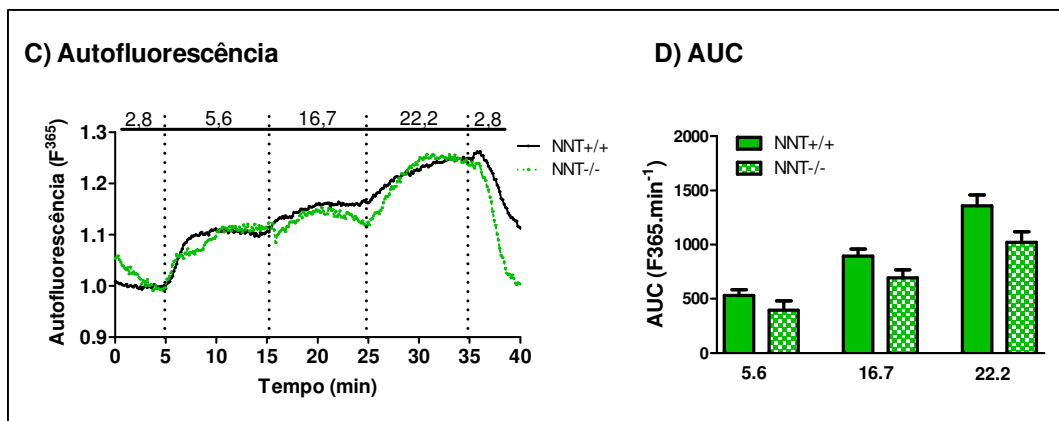
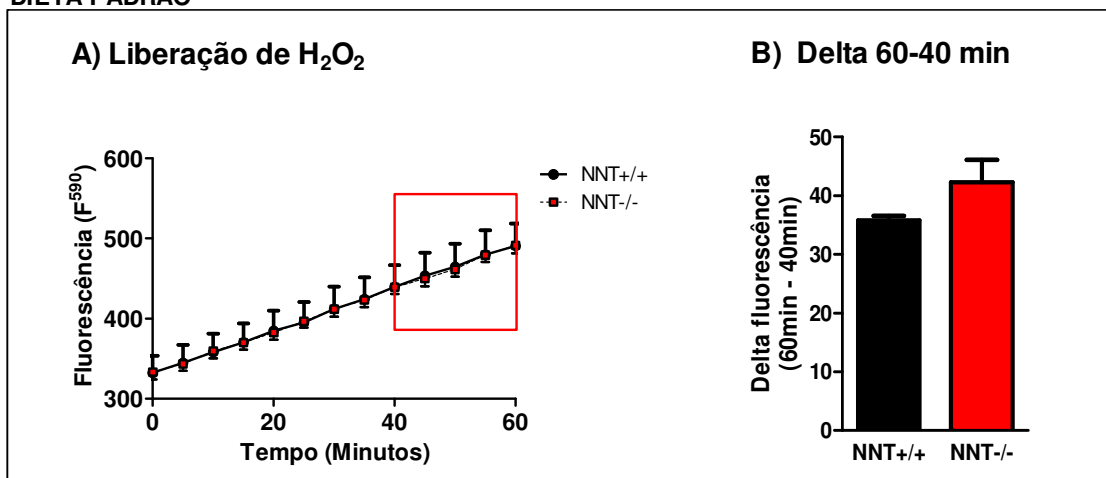


Figura 11: Autofluorescência de NAD(P)H em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em resposta à estimulação com glicose (16,7 e 22,2 mM). Painéis A-B animais sob dieta padrão e painéis C-D sob dieta hiperlipídica. Curvas de fluorescência em comprimento de onda 365 nm (A e C). Áreas sob as curvas (AUC) de fluorescência (B e D). Média $\pm$ ep (n=9 para A-B, n=4 para C e D). Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

DIETA PADRÃO



DIETA HIPERLIPÍDICA

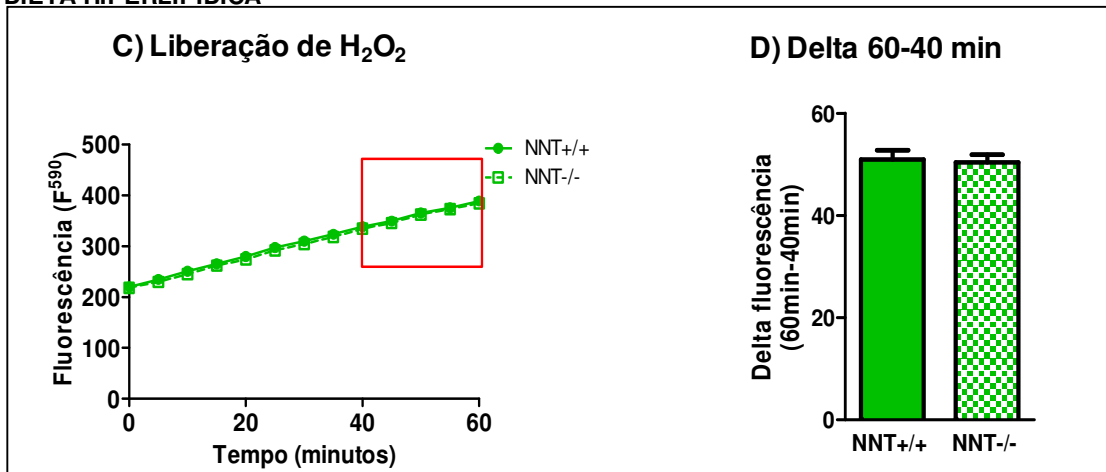
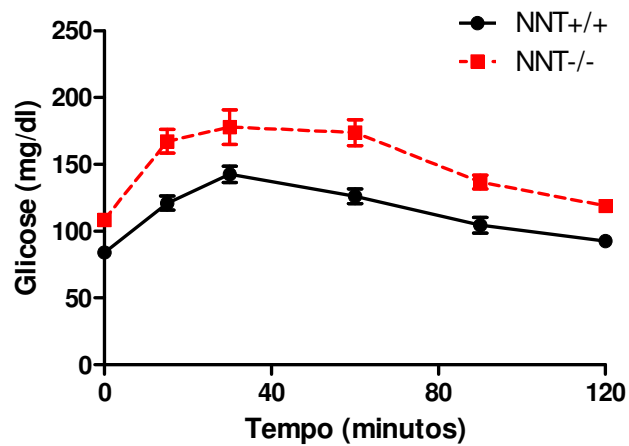


Figura 12: Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Amplex Ultra Red) em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-). Painéis A-B animais sob dieta padrão e painéis C-D sob dieta hiperlipídica. Curvas de fluorescência (A e C). Delta de 60 a 40 minutos das curvas dos painéis A e C (B e D). Foram usados grupo de 25 ilhotas por animal estimuladas com 16,7 mM de glicose. Em paralelo, ilhotas incubadas com catalase (10000 U/ml) foram usadas para descontar background do sinal de fluorescência. Média $\pm$ ep (n=4 para A e B, n=5-6 para C e D, duplicatas e triplicatas). Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

A) Produção de glicose a partir de piruvato



B) AUC

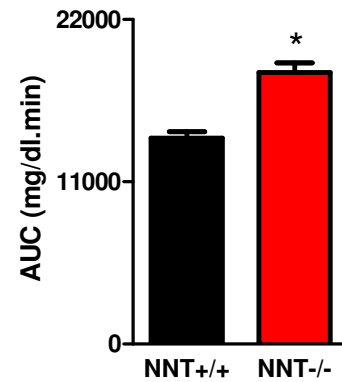
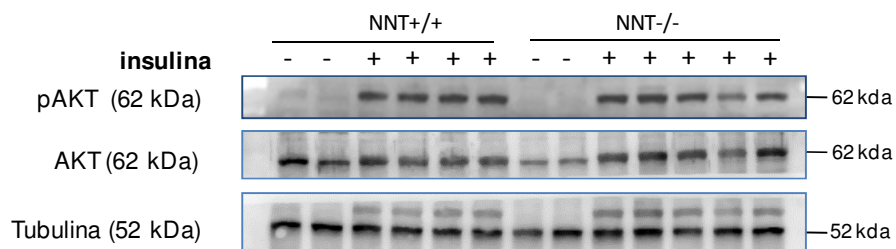
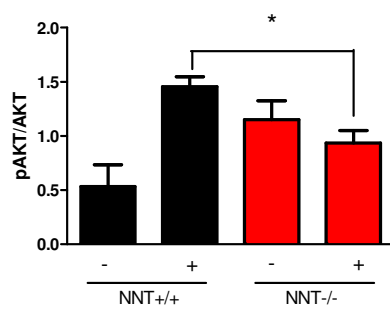


Figura 13: Produção de glicose hepática a partir do piruvato em camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão. Curvas glicêmicas após dose oral de piruvato (1,5 g/kg) (A). Áreas sob as curvas glicêmicas (AUC) (B). Média $\pm$ ep (n=4-6). Test T de Student; *p<0,05.

A) Western Blot



B) pAKT/AKT



C) AKT /Tubulina

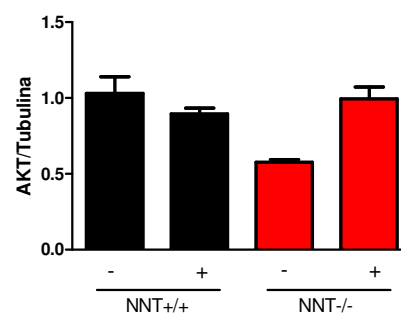
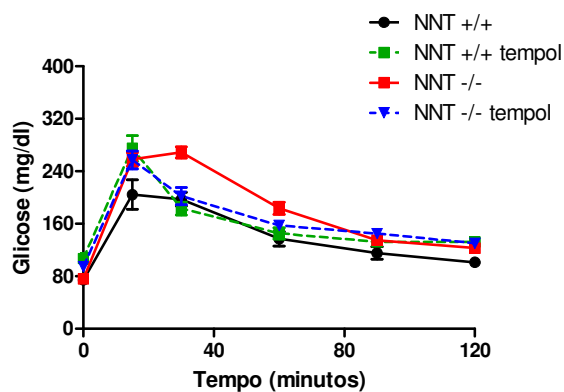


Figura 14: Sinalização da insulina em fígado. Expressão da Akt e sua fosforilação (Thr 308) em fígado de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão após 5 minutos de injeção ip de insulina (0,1 U/kg) ou salina. Imagens do Western Blot (A). Quantificação das imagens (B, C). Média $\pm$ ep (n=4-5). Test T de Student; *p<0,05.

A) Teste de tolerância à glicose



B) AUC

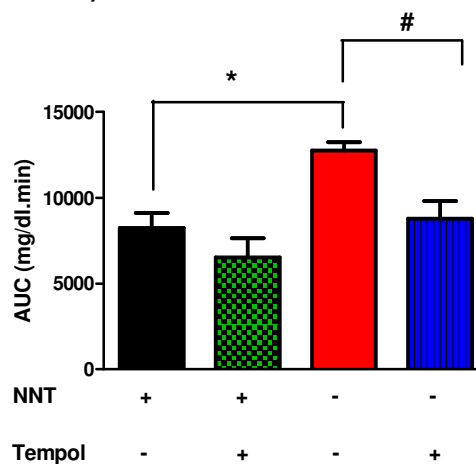


Figura 15: Teste de tolerância à glicose (GTT) de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) com e sem tratamento com antioxidante tempol (3 mM) na água de beber durante 1 mês e dieta padrão. Curvas glicêmicas após dose oral de glicose 1,5 g/kg (A). Áreas sob as curvas glicêmicas (AUC) (0-120 minutos) (B). Média±ep (n=4-5). Anova Two-Way; Pós teste Bonferroni *p=0,04; #p=0,009.

Figura suplementar 01

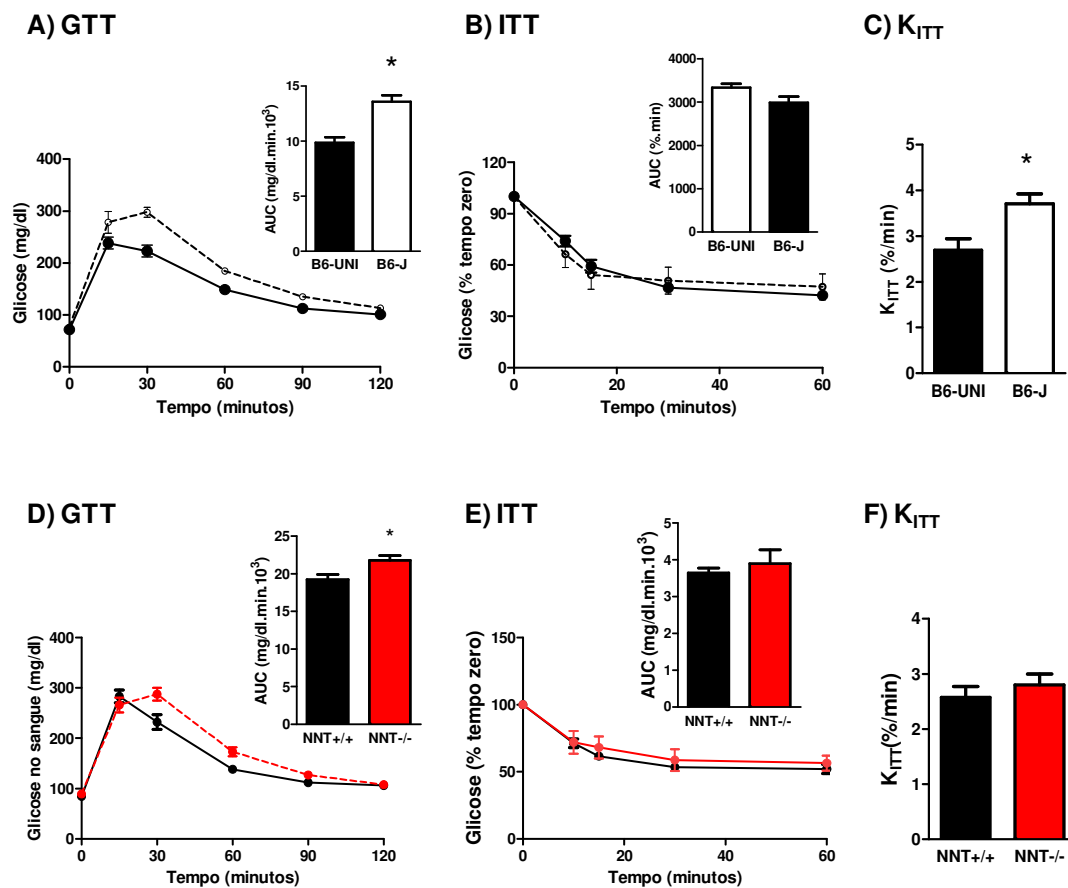


Figura 01: Homeostase glicêmica de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI e NNT+/+) e mutada (B6-J e NNT-/-) em dieta padrão com 2 meses de idade. Painéis A, B e C: camundongos B6-UNI vs B6-J. Painéis D, E e F: camundongos NNT+/+ vs NNT-/. Curvas glicêmicas após dose oral de glicose (1,5 kg/g) e área sob as curvas (AUC) (A e D). Curvas glicêmicas após dose intraperitoneal de insulina (0,75U/kg) e AUC (0-30 minutos) (B e E). Velocidades de decaimento da glicose (K_{ITT}) (0-15 minutos) (C e F). Média±ep (n=6-7 para A-C, n=6-8- para D-F). Test T de Student; *p<0,05.

CAPÍTULO 2

Efeito da mutação da NNT no metabolismo lipídico

Estudo em linhagens B6-J (mutante da NNT) e B6-UNI (NNT intacta)

Os parâmetros de composição corporal e lípides hepáticos das linhagens independentes B6-J e B6-UNI mantidas em dieta padrão estão apresentados na **Tabela 1**. Observamos diferenças marcantes entre as 2 linhagens. Os mutantes B6-J apresentam aumento nos depósitos visíveis de gordura epididimal (64%), subcutâneo da cintura (2x) e tecido adiposo marrom (24%) e redução significativa da massa magra da carcaça (8%). Além disso, o peso relativo do fígado está diminuído (9%) e o teor de triglicérides hepático está significativamente elevado (30%) nos animais mutantes (B6-J), indicando esteatose hepática nestes animais, mesmo sob dieta padrão. Quando os animais foram submetidos a 20 semanas de dieta hipelipídica, observamos a manutenção das alterações de composição corporal (**Tabela 2**). Verificamos que os animais mutantes B6-J apresentaram aumento de 20% no peso corporal final e de 46% no ganho de peso corporal, aumento na massa dos tecidos adiposos perigonadal e marrom (34% e 54%, respectivamente), sem alteração da massa do tecido adiposo subcutâneo (**Tabela 2**). A massa hepática e o teor de colesterol hepático mantiveram-se semelhantes nas duas linhagens independentes, porém ocorreu aumento de 3 vezes no conteúdo de triglicérides hepático (**Tabela 2**), mostrando um agravamento da esteatose hepática induzida por dieta nos animais mutantes para NNT (B6-J) em relação à observada em dieta padrão.

Coerentemente com nossos resultados, Nicholson e colaboradores (2010) mostraram que, quando alimentados por 14 semanas com dieta rica em gordura (60 Kcal%), os animais B6-J apresentaram maior adiposidade corporal (25%) que controles C57BL/6N (NNT intacta), esta última proveniente do *National Institute of Health* (USA). Fisher-Wellman e colaboradores (2016) mostraram aumento de adiposidade nos animais B6-J quando compararam aos B6-N em dieta padrão. No entanto, quando alimentados por 6 semanas com dieta HF (45 Kcal%), os animais B6-J apresentaram redução da massa adiposa comparados aos controles B6-N.

As concentrações plasmáticas de lipídios e adipocinas são apresentadas na **Tabela 3** (dieta padrão) e **Tabela 4** (dieta hiperlipídica). Sob dieta padrão, observamos um marcado aumento (55%) da concentração plasmática de leptina nos animais

mutantes (B6-J) (**Tabela 3**), sem diferenças significativas nos demais parâmetros. Sob dieta hiperlipídica, observamos aumento nos níveis plasmáticos de colesterol (20%) e de leptina (2x) nos animais mutantes B6-J quando comparados aos controles B6-UNI (**Tabela 4**). Portanto, a leptinemia aumentada nos B6-J confirma os dados de gravimetria dos depósitos adiposos, mostrando que os mutantes B6-J tem maior adiposidade corporal seja na dieta padrão, seja na hiperlipídica.

Buscamos em seguida identificar quais mecanismos estariam envolvidos no aumento significativo da adiposidade nos animais B6-J (NNT mutada). Assim, realizamos medidas do balanço alimentar (**Figura 1**) e do metabolismo corporal (**Figura 2**). Observamos que não houve alterações significativas de ingestão alimentar e excreção fecal entre as duas linhagens, tanto na vigência de dieta padrão, quanto em dieta hiperlipídica (**Figura 1**).

Em seguida determinamos a taxa metabólica corporal in vivo, por calorimetria indireta, durante 24 horas, nas duas linhagens independentes (**Figura 2**). Em dieta padrão, observamos redução de VO_2 (9-12%), VCO_2 (13-14%) e de gasto energético total (EE, 10-14%), tanto no período claro como no escuro, nos animais mutantes B6-J quando comparados aos B6-UNI (**Figura 2A-C**). O quociente respiratório foi semelhante entre os grupos de animais. Após dieta hiperlipídica, também observamos redução significativa de VO_2 , VCO_2 e gasto energético corporal nos camundongos B6-J, porém apenas no período claro (**Figura 2D-F**). O quociente respiratório também não variou entre os grupos sob dieta hiperlipídica. Esses resultados indicam que a redução do metabolismo corporal dos camundongos mutantes B6-J contribui para sua maior adiposidade.

Para investigar mais afundo os mecanismos responsáveis pela maior adiposidade e maior acúmulo de gordura hepática, quantificamos os processos de lipogênese de novo e retenção de lípidos provenientes da dieta.

A lipogênese, estimada pela incorporação de $^3H-H_2O$ em lipídios, nos tecidos adiposos (perigonadal e subcutâneo) e tecido hepático está apresentada na **Figura 3** e a capacidade de retenção dos lipídios exógenos está mostrada na **Figura 4**. Não observamos diferenças significativas de lipogênese ou retenção de lípidos da dieta nos depósitos adiposos das 2 linhagens, B6-J e B6-UNI. No entanto, detectamos aumento significativo de retenção de lípidos dietéticos no fígado (72%) dos B6-J em relação aos B6-UNI, o que justifica o quadro de esteatose hepática instalado nestes camundongos mutantes da NNT (B6-J). A maior retenção de lípidos no fígado pode ser decorrência de

uma limitação do sistema de exportação de lípidos, ou seja, no processo de confecção e secreção das VLDLs.

Em resumo, comparados aos camundongos B6-UNI, os mutantes de NNT B6-J apresentaram aumento de ganho de peso corporal, redução de massa magra, aumento de massa adiposa, aumento nos níveis de leptina, redução do gasto energético corporal, aumento do conteúdo de triglicérides hepático, e maior retenção hepática de lípidos dietéticos.

Semelhante aos nossos resultados, Fisher-Wellman e colaboradores (2016) estudaram os camundongos mutantes C57BL/6J comparados aos C57BL/6N, com NNT intacta, e observaram redução da taxa de metabolismo corporal nos camundongos C57BL/6J.

Considerando-se que outras diferenças genéticas entre estas duas linhagens independentes podem interferir direta ou indiretamente no fenótipo metabólico, reavaliamos o metabolismo lipídico em linhagens congênicas, com 99,2% de homogeneidade de background genético, obtidas por retro-cruzamentos até a sétima geração (Ronchi et al, 2016).

Estudo em linhagens congênicas NNT^{-/-} (mutante da NNT) e NNT^{+/+} (NNT intacta)

A adiposidade e conteúdo de lipídeos hepáticos nos animais NNT^{-/-} e NNT^{+/+} estão mostrados na **Figura 5** (sob dieta padrão) e **Figura 6** (após dieta hiperlipídica). Os resultados mostram que o fenótipo de aumento de adiposidade na vigência de dieta padrão não depende exclusivamente da mutação da NNT, uma vez que não observamos diferenças significativas entre as linhagens congênicas, isto é, o fenótipo do aumento dos depósitos adiposos dos animais NNT^{-/-} desapareceu nesta condição de dieta padrão (**Figura 5**). Porém, após 20 semanas de dieta hiperlipídica, observamos aumento significativo dos depósitos adiposos epididimal (26%) e do tecido adiposo marrom (40%) dos animais deficientes da NNT (**Figura 6**). O depósito subcutâneo também foi 46% maior nos mutantes, embora sem atingir significância estatística ($p=0,13$). Quanto aos parâmetros hepáticos, tanto em dieta padrão (**Fig. 5**), quanto em dieta hiperlipídica (**Fig. 6**), verificamos que os camundongos NNT^{-/-} apresentaram redução da massa hepática (11-13%) e aumento no teor de triglicérides hepático (44-49%) quando comparado aos camundongos com NNT intacta (NNT^{+/+}) nas duas dietas. Nenhuma diferença foi encontrada no teor de colesterol hepático entre as linhagens congênicas.

As concentrações plasmáticas de lipídios e leptina nas linhagens congênicas estão apresentadas na **Tabela 5** (dieta padrão) e **Tabela 6** (dieta hiperlipídica). Em dieta padrão, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de triglicérides e leptina entre os grupos, mas houve aumento significativo nos níveis plasmáticos de colesterol (17%) nos camundongos NNT^{-/-} (NNT mutada) em relação aos NNT^{+/+} (NNT intacta) (**Tabela 5**). A dieta HF agravou ainda mais a hipercolesterolemia causada pela falta da NNT (aumento de 37%). De acordo com o aumento dos depósitos adiposos, os camundongos mutantes da NNT (NNT^{-/-}) sob dieta HF apresentaram aumento significativo de 61% nos níveis plasmáticos de leptina (**Tabela 6**). Os níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral (TNF- α , indicativo de inflamação) foram semelhantes entre as duas linhagens congênicas NNT^{+/+} e NNT^{-/-} sob dieta hiperlipídica ($4,35 \pm 0,43$ vs $4,28 \pm 0,44$, respectivamente).

O balanço alimentar (ingestão e excreção fecal) frente as duas dietas não diferiu nas linhagens congênicas (**Figura suplementar 01**).

A taxa metabólica corporal também foi similar nos dois grupos de animais, NNT^{-/-} e NNT^{+/+}, quando em dieta padrão (**Figura 7A-C**). A temperatura corporal retal mensurada por 3 dias consecutivos também foi semelhante em ambas linhagens ($36,8 \pm 0,32$ vs $37,3 \pm 0,13$, respectivamente para NNT^{+/+} e NNT^{-/-}), corroborando com a similaridade do metabolismo corporal em dieta padrão. Porém, quando desafiados com dieta hiperlipídica, a taxa metabólica corporal estava reduzida significativamente, tanto no período claro quanto no escuro, verificada no consumo de oxigênio (VO₂, 15-16%), produção de dióxido de carbono (VCO₂, 17-19%) e gasto energético (EE, 16-18%) (**Figura 7D-F**) nos animais mutantes NNT^{-/-} quando comparados aos NNT^{+/+}. O quociente respiratório não foi alterado entre os grupos (período claro: $0,76 \pm 0,04$ vs $0,66 \pm 0,03$; período escuro: $0,81 \pm 0,04$ vs $0,72 \pm 0,04$, respectivamente para NNT^{+/+} e NNT^{-/-}).

Os mecanismos funcionais responsáveis pelo acúmulo lipídico no fígado foram estudados. Observamos que não houve diferenças significativas na retenção de lípidos da dieta (**Figura 8A**). Porém, a secreção de hepática de triglicérides em VLDLs estava reduzida em aproximadamente 35% (**Figura 8B-C**), mostrando que a deficiência da NNT compromete a eficiência do sistema de exportação dos lípidos hepáticos.

Em conjunto, esses resultados demonstram que a mutação da NNT não é determinante para induzir alterações na adiposidade, leptinemia e gasto energético corporal na vigência de dieta padrão. No entanto, quando desafiados com dieta HF, os

mutantes de NNT desenvolvem maior adiposidade, colesterolemia, leptinemia e menor gasto energético corporal, mostrando que a NNT é de fato determinante de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Quanto ao fígado, a mutação da NNT por si só é determinante do desenvolvimento do quadro de esteatose hepática, tanto com dieta pobre (dieta padrão) como rica em gordura.

Recentemente, nosso grupo estudou os mecanismos celulares bioquímicos envolvidos na evolução da doença hepática gordurosa nos camundongos congênicos deficientes de (NNT^{-/-}) submetidos à dieta hiperlipídica por 20 semanas (Navarro et al., 2017). Neste estudo, o desequilíbrio redox devido à ausência da NNT foi caracterizado em mitocôndrias isoladas dos fígados de camundongos NNT^{-/-} em relação aos NNT^{+/+}. Verificou-se que a mutação da NNT em conjunto com a dieta hiperlipídica aumenta a liberação mitocondrial de H₂O₂, inibe a atividade da aconitase (uma enzima mitocondrial alvo de superóxido) e aumenta a susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca²⁺ (mesmo na ausência de dieta HF), um fenômeno que pode levar à morte celular. A dieta HF ainda inibe a atividade da piruvato desidrogenase (PDH) e reduz a metabolização de peróxido orgânico pelas mitocôndrias hepáticas. Assim, este estudo demonstrou que o desbalanço redox mitochondrial potencializa a progressão da esteatose simples para esteatohepatite (Navarro et al, 2017).

Considerando que as alterações hepáticas e mitocondriais ocorrem mesmo na vigência de dieta pobre em gordura, podemos propor que a disfunção mitocondrial (produção de oxidantes e transição de permeabilidade mitocondrial, entre outras) prejudica a sinalização da insulina, sendo a resistência à insulina determinante do acúmulo lipídico hepático, principalmente por comprometer a secreção de VLDL. Outros estudos dão suporte a esta proposição. A indução de disfunção mitocondrial em linhagens de células adiposas (3T3-L1 diferenciadas) usando inibidores da cadeia respiratória (oligomicina A ou antimicina A) ou por knockdown do fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA), causa super-produção de EROS e atenuação da sinalização da insulina (redução da captação da glicose, redução da fosforilação de AKT, e redução da expressão do GLUT-4) (Wang et al, 2013). Ainda, em modelos de resistência à insulina em cultura de células musculares (antimycin A, C2-ceramida, ferutinina, and palmitato), a inibição farmacológica da transição de permeabilidade mitocondrial com ciclosporina A foi suficiente para prevenir a resistência à insulina, como demonstrado pela translocação do GLUT4 para a membrana (Taddeo et al, 2013).

Tabela 1: Composição corporal e lípides hepáticos de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão.

	B6-UNI (NNT intacta)	B6-J (NNT mutada)
Peso corporal (g)	30,0 ± 0,60 (16)	27,0 ± 0,40*
Massa magra da carcaça (g%)	83,3 ± 2,16 (7)	76,7 ± 1,68*
Massa gorda da carcaça (g%)	20,3 ± 1,51 (8)	23,3 ± 1,64 (8)
Adiposo epididimal (g%)	1,1 ± 0,09 (18)	1,8 ± 0,13* (15)
Adiposo subcutâneo (g%)	0,5 ± 0,14 (4)	0,9 ± 0,10* (4)
Adiposo marrom (g%)	0,17 ± 0,01 (4)	0,21 ± 0,01* (4)
Fígado (g%)	4,4 ± 0,10 (15)	4,0 ± 0,06* (13)
TG hepático (mg/g)	12,7 ± 1,04 (9)	16,4 ± 0,87* (9)
COL hepático (mg/g)	2,1 ± 0,14 (8)	1,6 ± 0,22 (6)

Média ± ep (n) . Test T de Student: *p<0,05

Tabela 2: Composição corporal e lípides hepáticos de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta hiperlipídica

	B6-UNI (NNT intacta)	B6-J (NNT mutada)
Peso corporal (g)	35,3 ± 1,14 (9)	42,1 ± 1,50 [*] (8)
Ganho de peso (g)	13,2 ± 0,70 (12)	19,0 ± 1,69 [*] (13)
Adiposo epididimal (g%)	3,5 ± 0,38 (9)	4,7 ± 0,37 [*] (8)
Adiposo subcutâneo (g%)	9,0 ± 0,70 (8)	9,4 ± 0,92 (6)
Adiposo marrom (g%)	0,4 ± 0,03 (8)	0,6 ± 0,07 [*] (8)
Fígado (g%)	3,4 ± 0,26 (7)	2,7 ± 0,34 (6)
TG hepático (mg/g)	25,6 ± 3,82 (7)	86,2 ± 0,8 (5) [*]
COL hepático (mg/g)	3,7 ± 0,30 (7)	4,51 ± 0,60 (6)

Média ± ep (n) . Test T de Student: *p<0,05

Tabela 3: Concentrações plasmáticas de lipídios e adipocinas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em **dieta padrão**.

	B6-UNI (NNT intacta)	B6-J (NNT mutada)
Colesterol jejum (mg/dl)	87,9±3,55 (18)	85,5±3,69 (14)
Triglicérides jejum (mg/dl)	66,8±7,15 (12)	55,2±3,78 (14)
Ácidos graxos (mmol/L)	0,6±0,04 (13)	0,6±0,19 (18)
Adiponectina (ng/ml)	6,6 ±1,00 (4)	5,7±0,45 (9)
Leptina (ng/ml)		
Jejum	0,8±0,24 (6)	0,8±0,14 (8)
Alimentado	3,6±0,76 (6)	5,6±0,53* (8)

Média±ep (n). Test T de Student: *p<0,05

Tabela 4: Concentrações plasmáticas de lipídios e adipocinas de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em **dieta hiperlipídica**.

	B6-UNI (NNT intacta)	B6-J (NNT mutada)
Colesterol (mg/dl)	123,0±6,65 (13)	146,3±7,67*
Triglicérides (mg/dl)	110,4 ± 7,52 (13)	104,5 ± 3,95 (12)
Adiponectina (mg/dl)	13,4±2,68 (5)	12,7±2,76 (5)
Leptina (mg/dl)	10,9±4,38 (5)	22,3±2,86* (6)

Média±ep (n) . Test T de Student: *p<0,05 . Lípides determinados no estado de jejum e adipocinas no estado alimentado

Tabela 5: Concentrações plasmáticas de lipídios e adipocina de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em **dieta padrão**

	NNT +/+ (NNT intacta)	NNT -/- (NNT mutada)
Triglicérides jejum (mg/dl)	67,2 ± 7,70 (4)	74,5 ± 7,36 (5)
Colesterol jejum (mg/dl)	85,3±3,84 (4)	100,0±3,80 (4)
Leptina alimentado (ng/ml)	5,2 ± 1,16 (5)	3,18 ± 0,77 (8)

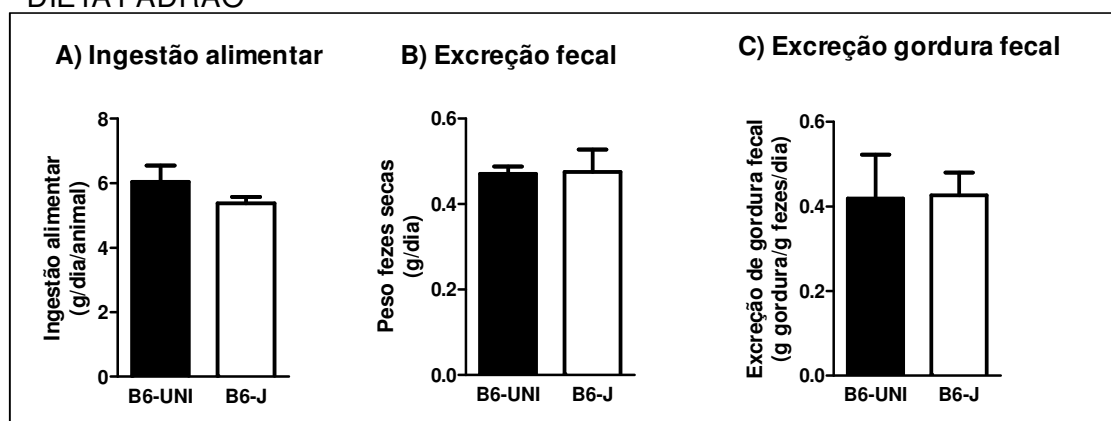
Média±ep (n). Test T de Student; *p<0,05.

Tabela 6: Concentrações plasmáticas de lipídios e adipocina de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em **dieta hiperlipídica**.

	NNT +/+ (NNT intacta)	NNT -/- (NNT mutada)
Triglicérides jejum (mg/dl)	116,4 ± 6,98 (5)	131,0 ± 4,43 (5)
Colesterol jejum (mg/dl)	153,1 ± 14,03 (5)	210,5 ± 18,10* (5)
Leptina (ng/ml)		
Jejum	12,1 ± 2,02 (4)	19,5 ± 2,65# (4)
Alimentado	22,2 ± 1,77 (4)	26,4 ± 1,84 (4)

Média±ep (n). Test T de Student; *p<0,05.

DIETA PADRÃO



DIETA HIPERLIPÍDICA

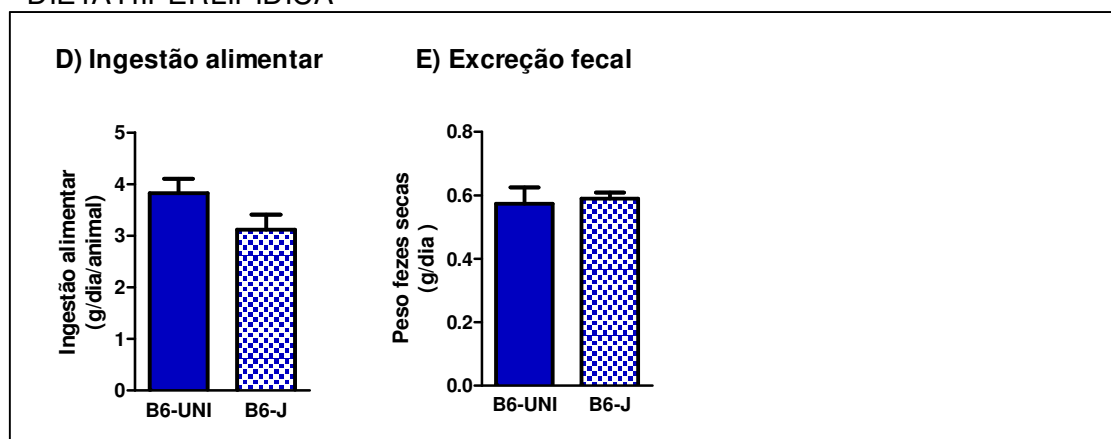


Figura 1: Balanço alimentar (24 horas) em camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Painéis A-C sob dieta padrão (chow) e painéis D e E sob dieta hiperlipídica. Ingestão alimentar (A, D); Excreção fecal (B, E); Excreção de gordura fecal (C). Média $\pm$ ep (n=4 para A-C, n=5 para D-E). Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

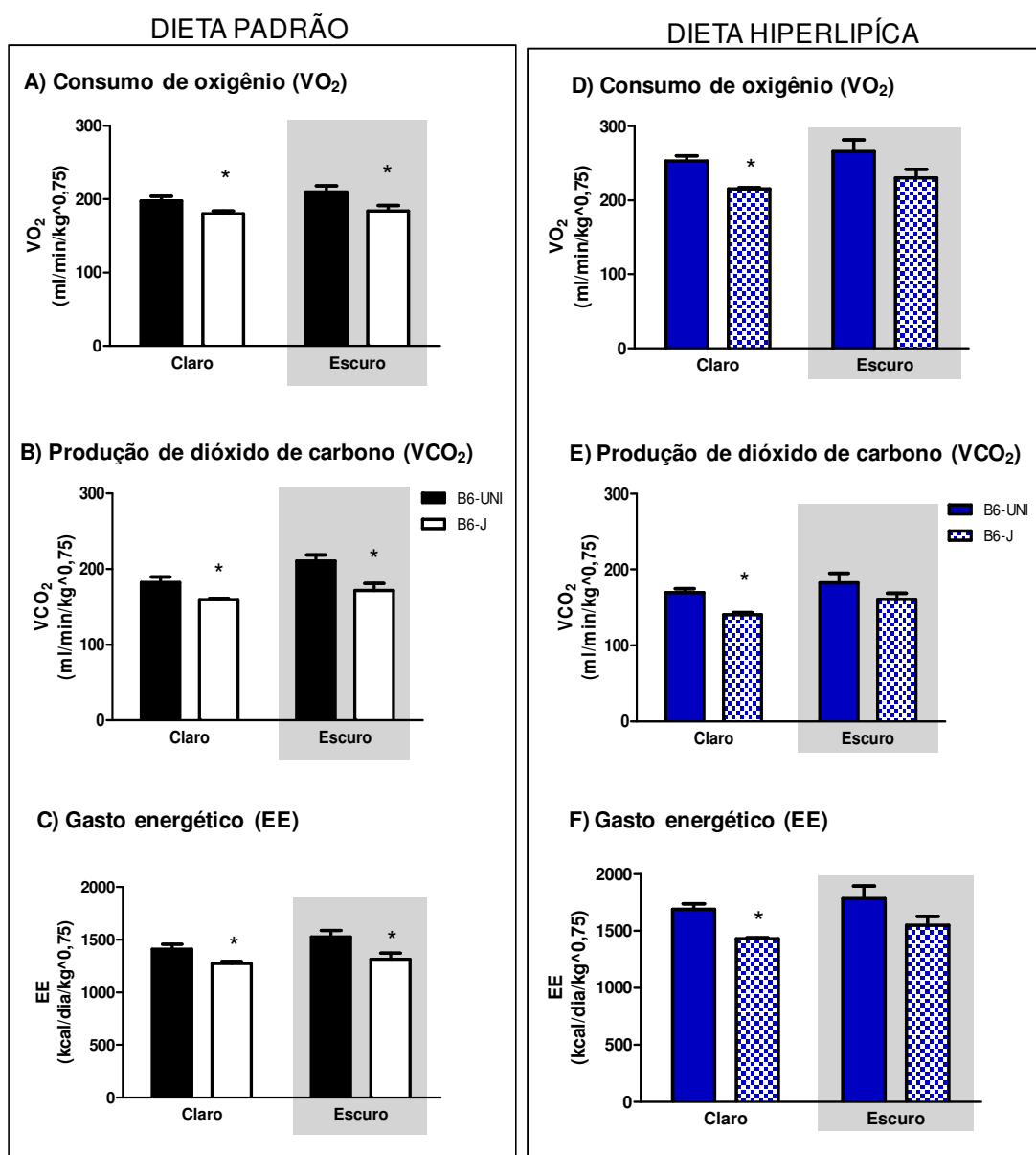


Figura 2: Indicadores de metabolismo corporal por calorimetria indireta durante os períodos claro e escuro (24 horas) de camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J). Painéis A-C sob dieta padrão (chow) e painéis D-F sob dieta hiperlipídica. Médias das áreas sob as curvas do consumo de oxigênio (VO_2) (A, D), da produção de CO_2 (VCO_2) (B, E), e do gasto energético (EE) (C, F). Média $\pm$ ep (n= 5-6 para A-C, n= 4 para D-F), Teste t de Student; *p<0,05. Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

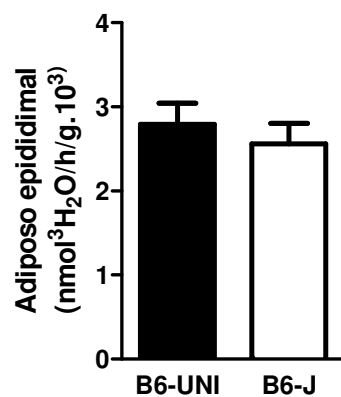
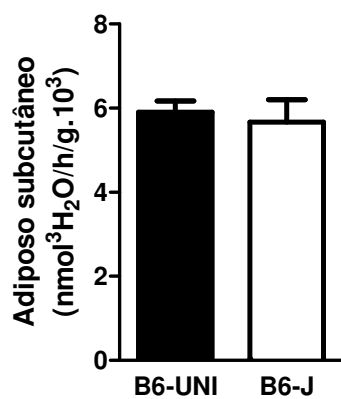
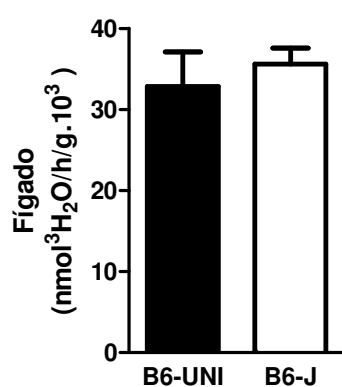
A) T. A. Epididimal**B) T. A. Subcutâneo****C) Fígado**

Figura 3: Lipogênese *in vivo*: incorporação de ³H em lipídios totais pelo tecido adiposo (T.A.) epididimal (A), subcutâneo (B) e fígado (C) em camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão (chow). Média±ep (n=6-7). Test T de Student.

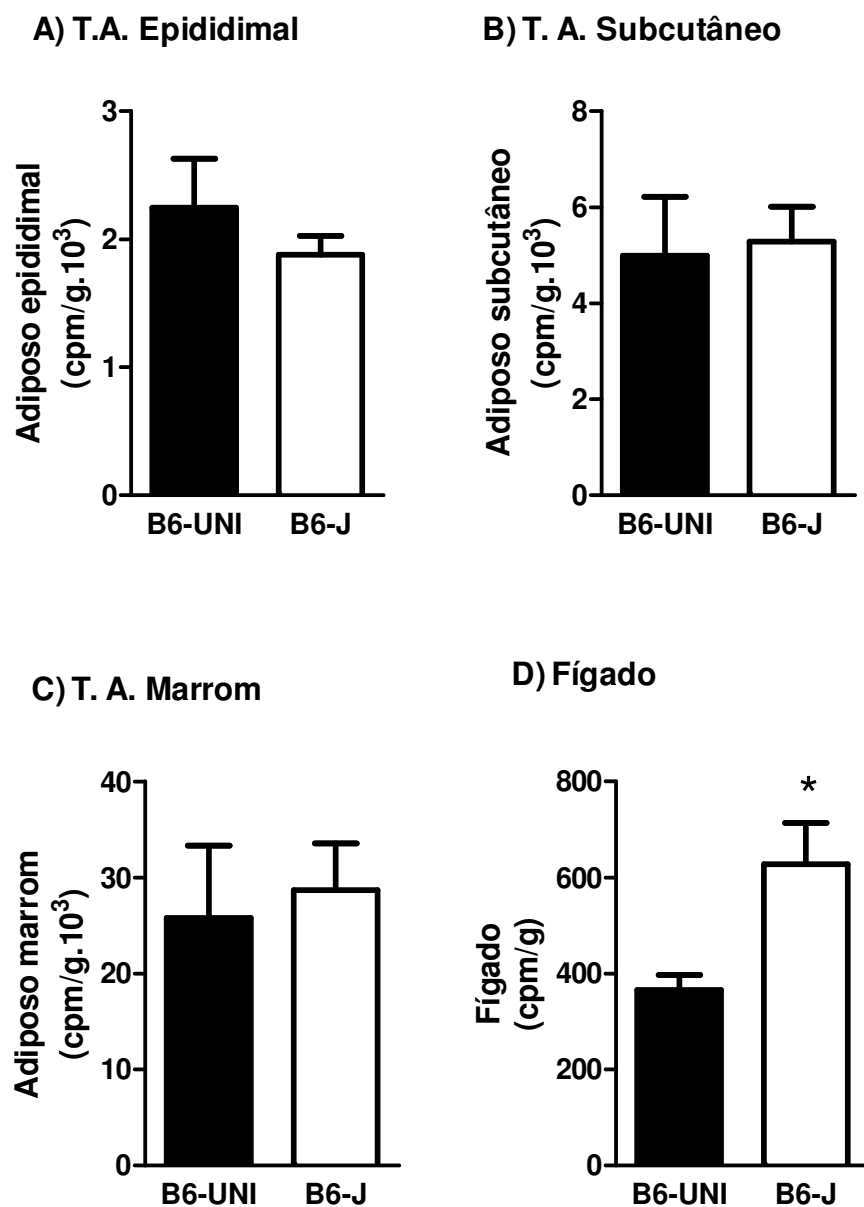


Figura 4: Retenção de ácidos graxos provenientes da dieta (24 horas) nos tecidos adiposos epididimal (A), subcutâneo (B), marrom (C) e no fígado (D) após dose oral de trioleína marcada com trício (³H-TO) em óleo de milho (5 uCi e 180 mg/animal) em camundongos C57BL6 com NNT intacta (B6-UNI) e mutada (B6-J) em dieta padrão (chow). Média±ep (n=6-7). Test T de Student; *p<0,05.

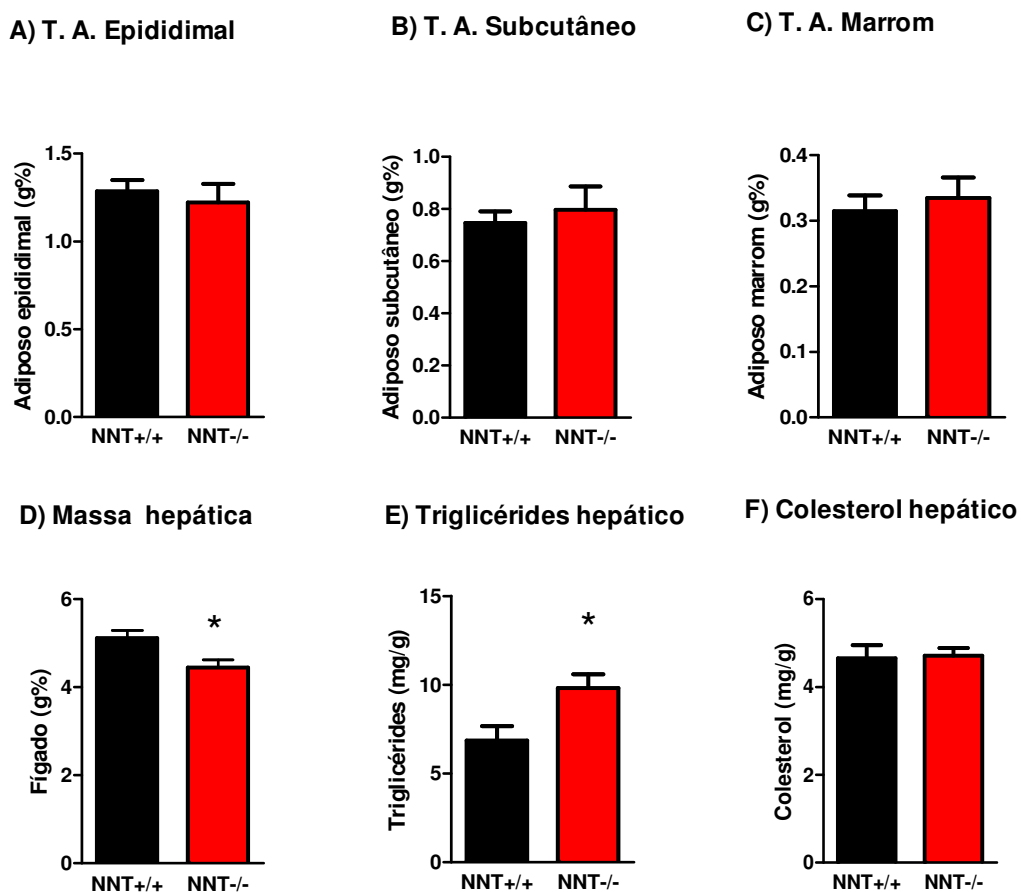


Figura 5: Composição corporal e lípidos hepáticos de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão (chow). Tecidos adiposos (T. A.): epididimal (A), subcutâneo (B), marrom (C). Massa hepática (D), teor de triglicérides (E) e colesterol hepático (F). Média±ep (n= 4-5 para B e n=9 para A, C-F). Test T de Student; *p<0,05.

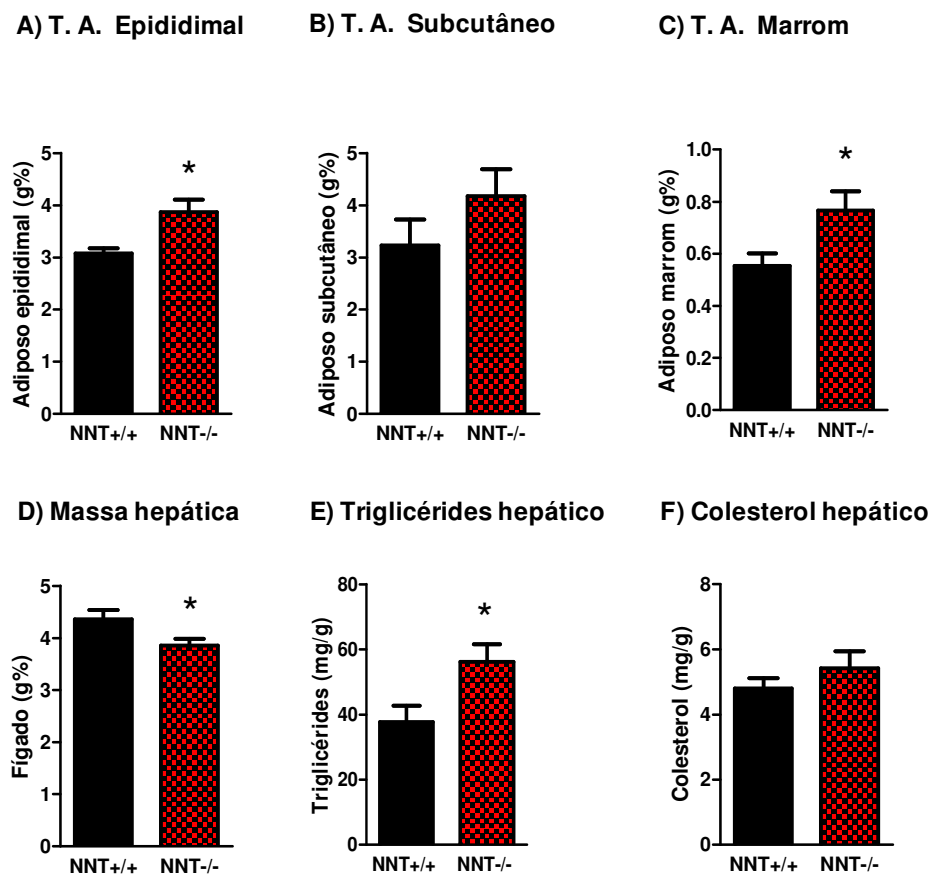


Figura 6: Composição corporal e lípides hepático de camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta hiperlipídica. Tecidos adiposos (T. A.): epididimal (A), subcutâneo (B), marrom (C). Massa hepática (D), teor de triglicérides (E) e colesterol hepático (F). Média $\pm$ ep (n=5 para B, n=12 para A, C-F). Test T de Student; *p<0,05. Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

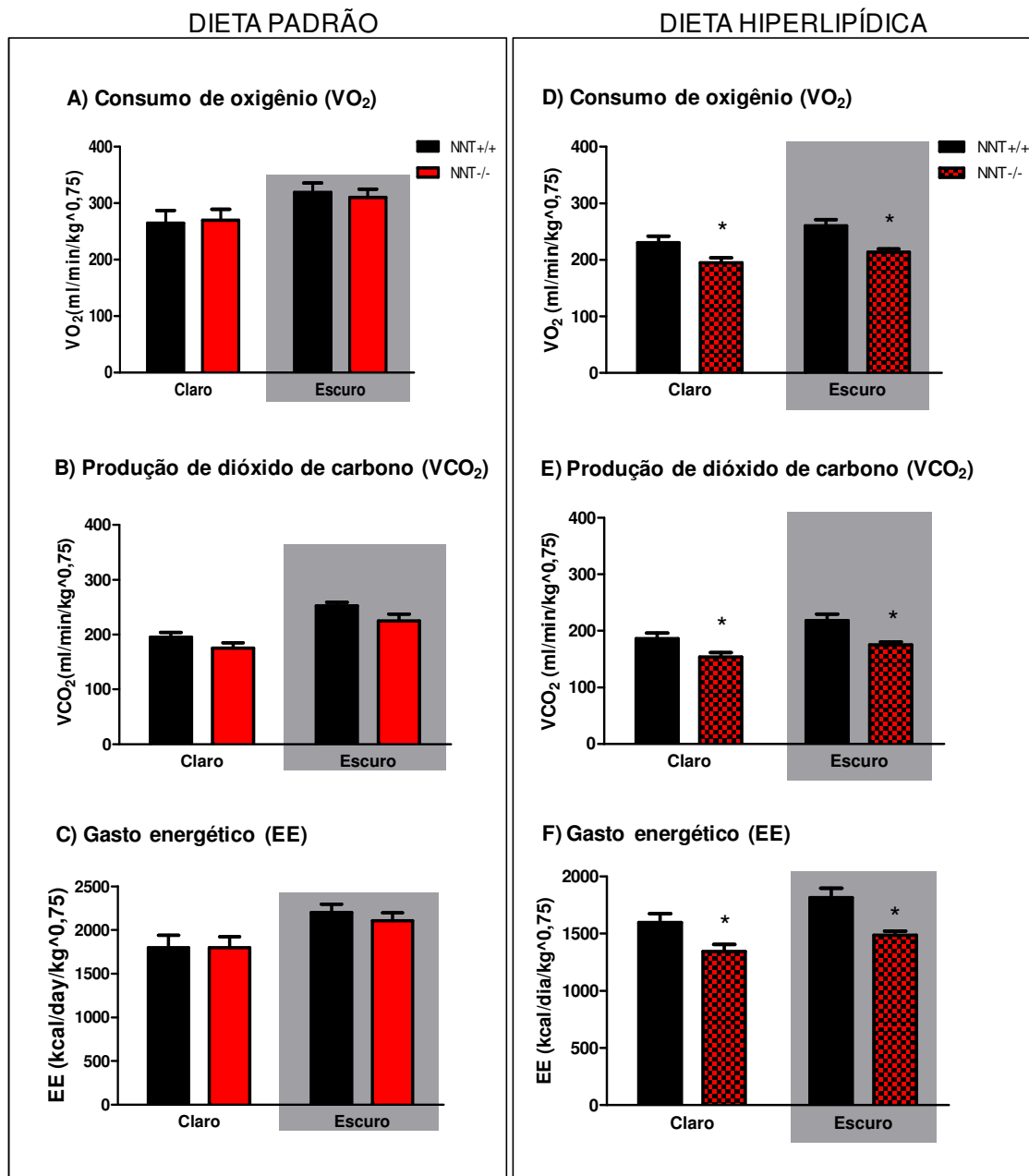
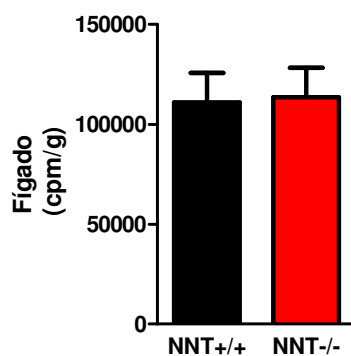
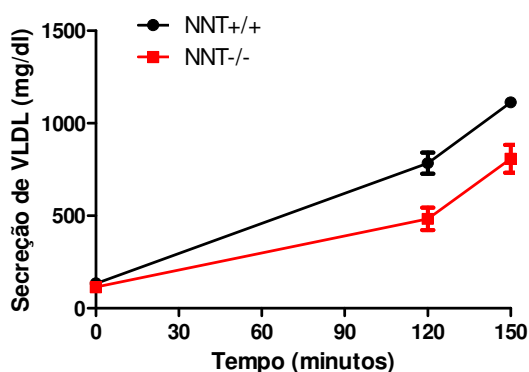


Figura 7: Indicadores de metabolismo corporal por calorimetria indireta do período claro e escuro (24 horas) de camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-). Painéis A-C sob dieta padrão (chow) e painéis D-F sob dieta hiperlipídica. Médias das áreas sob as curvas (AUC) do consumo de oxigênio (VO_2) (A, D), da produção de CO_2 (VCO_2) (B, E) e do gasto energético (EE) (C, F). Média $\pm$ ep (n=4 para painéis A-C, n=4-6 para painéis D-F). Teste t de Student; *p<0,05. Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

A) Retenção 3H-TO no fígado



B) Secreção de VLDL



C) AUC

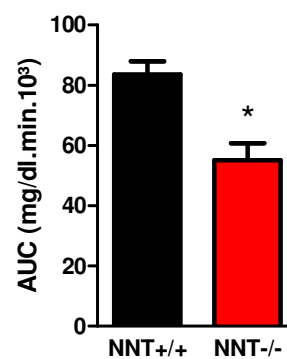
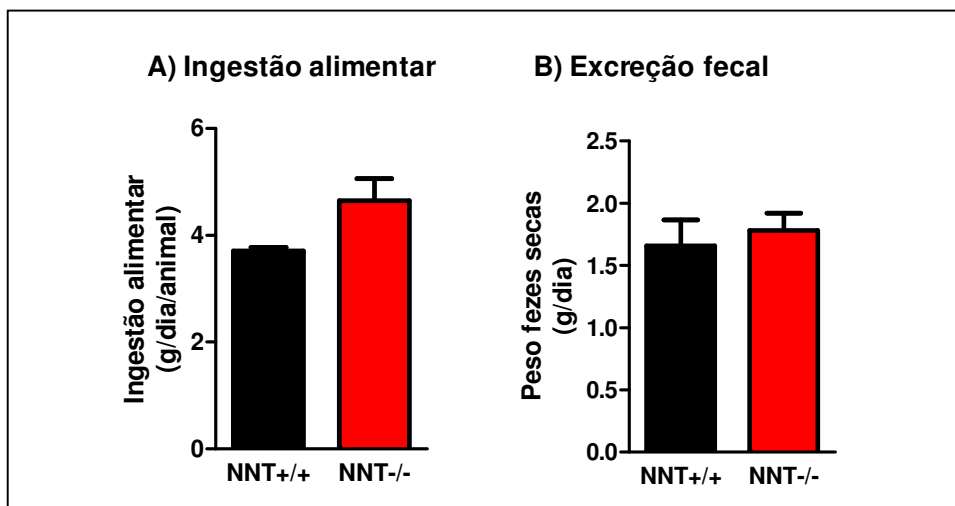


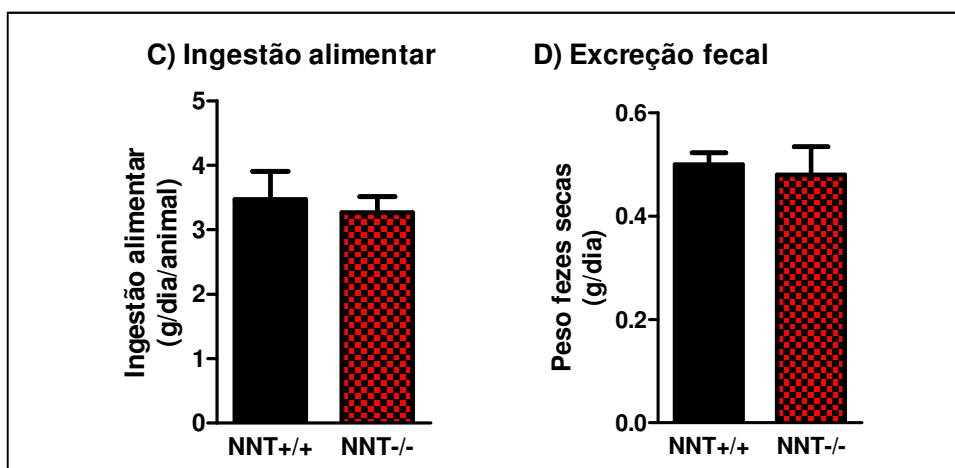
Figura 8: Retenção de lípidos da dieta (3H-trioleína) no fígado (A) e secreção hepática de VLDL (B-C). Radioatividade determinada 24h após administração oral de trioletina marcada com trício (3H-TO) em óleo de milho (5 uCi e 180 mg/animal) (A). Concentrações de triglicérides após a injeção intraperitoneal de Triton WR 1339 (500 mg/kg) em camundongos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-) em dieta padrão (chow) (B). Área sob a curva (AUC) (C). Média±ep (n=4). Teste t de Student; *p<0,05.

Figura suplementar 01

DIETA PADRÃO



DIETA HIPERLIPÍDICA



Balanço alimentar (24 horas) em camundongos congênicos C57BL6 com NNT intacta (NNT+/+) e mutada (NNT-/-). Painel A e C: ingestão alimentar. Painel B e D: peso total de fezes secas. Média $\pm$ ep (n=5). Experimentos com dieta hiperlipídica foram realizados com pelo menos 1 ano de intervalo em relação aos experimentos com dieta padrão.

CONCLUSÃO

1- A deficiência de NNT causa intolerância à glicose por induzir resistência hepática à insulina, revertida por tratamento com antioxidante. Além disso, contrário dos dados da literatura, a deficiência de NNT não afeta a secreção de insulina estimulada por glicose. Provavelmente outras diferenças genéticas entre sub-linhagens C57BL6 independentes são responsáveis pelo comprometimento da secreção de insulina estimulada por glicose nos animais C57BL/6J.

2- A deficiência da NNT não é determinante da adiposidade, leptinemia e gasto energético corporal na vigência de dieta padrão. No entanto, quando desafiados com dieta HF, os mutantes de NNT desenvolvem maior adiposidade, colesterolemia, leptinemia e menor gasto energético corporal, mostrando que a NNT é de fato determinante de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Quanto ao fígado, a deficiência da NNT é determinante do desenvolvimento do quadro de esteatose hepática, tanto com dieta pobre (dieta padrão) como rica em gordura, devido ao comprometimento do processo de secreção hepática de VLDL

3- Nossa proposta mecanística é de que a disfunção mitocondrial (produção de oxidantes e transição de permeabilidade mitocondrial, caracterizada previamente) nos mutantes de NNT prejudica a sinalização hepática da insulina, sendo a resistência à insulina determinante do acúmulo lipídico hepático, principalmente por comprometer a secreção de VLDL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1225–36.
- Adiels M, Westerbacka J, Soro-Paavonen A, Häkkinen AM, Vehkavaara S, Caslake MJ, Packard C, Olofsson SO, Yki-Järvinen H, Taskinen MR, Borén J. Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance. *Diabetologia.* 2007;50(11):2356-65.
- Ahrén B, Holst JJ. The cephalic insulin response to meal ingestion in humans is dependent on both cholinergic and noncholinergic mechanisms and is important for postprandial glycemia. *Diabetes.* 2001;50(5):1030-8.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 1997;7(4):261-9.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2007;30 Suppl 1:S42–S47.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2014;37 Suppl 1:S81-90.
- Ande SR, Nguyen KH, Grégoire Nyomba BL, Mishra S. Prohibitin-induced, obesity-associated insulin resistance and accompanying low-grade inflammation causes NASH and HCC. *Sci Rep.* 2016;6:23608.
- Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev.* 2008;60(3):311-57.
- Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013; 10: 330–44.
- Arkblad EL, Egorov M, Shakhparonov M, Romanova L, Polzikov M, Rydström J. Expression of proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase in mouse, human brain and *C elegans*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002;133(1):13-21.
- Arkblad EL, Tuck S, Pestov NB, Dmitriev RI, Kostina MB, Stenvall J, Tranberg M, Rydström J. A *Caenorhabditis elegans* mutant lacking functional nicotinamide nucleotide transhydrogenase displays increased sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(11):1518-25.
- Alsahli M., Shrayyef M.Z., Gerich J.E. Normal Glucose Homeostasis. In: Poretzky L. (eds) *Principles of Diabetes Mellitus*. Springer, Cham. 2017.
- Ashcroft SJ, Weerasinghe LC, Bassett JM, Randle PJ. The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets. *Biochem J.* 1972;126(3):525-32.
- Attané C, Peyot ML, Lussier R, Zhang D, Joly E, Madiraju SR, Prentki M. Differential Insulin Secretion of High-Fat Diet-Fed C57BL/6NN and C57BL/6NJ Mice: Implications of Mixed Genetic Background in Metabolic Studies. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159165.
- Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2131-57.
- Bindokas VP, Kuznetsov A, Sreenan S, Polonsky KS, Roe MW, Philipson LH. Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9796-801.

- Bouché C, Serdy S, Kahn CR, Goldfine AB. The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2004;25(5):807-30.
- Boucher J, Kleinriders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6(1). pii: a009191.
- Boudina S1, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright JJ, Hu XX, Aziz S, Johnson JJ, Bugger H, Zaha VG, Abel ED. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes.* 2007;56(10):2457-66.
- Bourne RR, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, Jonas JB, Keefe J, Leasher J, Naidoo K, Pesudovs K, Resnikoff S, Taylor HR; Vision Loss Expert Group. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob Health.* 2013;1(6):e339-49.
- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers AC. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(9):1087-97.
- Brown JC, Dryburgh JR, Ross SA, Dupré J. Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide. *Recent Prog Horm Res.* 1975;31:487-532.
- Butler AA, Kozak LP. A recurring problem with the analysis of energy expenditure in genetic models expressing lean and obese phenotypes. *Diabetes.* 2010;59(2):323-9.
- Caldwell S, Argo C. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2010;28(1):162-8.
- Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem.* 2003;278(28):25323-30.
- Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ; American Gastroenterological Association; American Association for the Study of Liver Diseases; American College of Gastroenterology. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology.* 2012;142(7):1592-609.
- Chandra R, Liddle RA. Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009; 25: 441-446.
- Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res.* 2010;2(3):316-31.
- Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(10):589-98.
- Clark AJ, McLoughlin L, Grossman A. Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor. *Lancet.* 1993;341(8843):461-2.
- Clarke DM, Bragg PD. Purification and properties of reconstitutively active nicotinamide nucleotide transhydrogenase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 1985;149(3):517-23.
- Colowick SP, Kaplan NO, Neufeld EF, Ciotti MM. Pyridine nucleotide transhydrogenase. I. Indirect evidence for the reaction and purification of the enzyme. *J Biol Chem.* 1952;195(1):95-105.

- Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH. The metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2008;29(7):777-822.
- Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO, Kolansky DM, Wolfe ML, Sarkis A, Millar JS, Ikewaki K, Siegelman ES, Gregg RE, Rader DJ. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 2007;356(2):148-56.
- Cui XB, Chen SY. White adipose tissue browning and obesity. *J Biomed Res.* 2016;31(1):1-2
- Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology.* 1968 Sep;83(3):572-84.
- Cushman SW, Wardzala LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 1980;255(10):4758-62.
- Dabkowski ER, Williamson CL, Bukowski VC, Chapman RS, Leonard SS, Peer CJ, Callery PS, Hollander JM. Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(2):H359-69.
- Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, Peelman F, Kastelein JJ, Péterfy M, Nieuwdorp M. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis.* 2010;211(1):1-8.
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998;114(4):842-5.
- Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology.* 2006;130(1):207-10.
- de Koning L, Malik VS, Kellogg MD, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Sweetened beverage consumption, incident coronary heart disease, and biomarkers of risk in men. *Circulation.* 2012; 125: 1735–41.
- de Koning L, Malik VS, Kellogg MD, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Sweetened beverage consumption, incident coronary heart disease, and biomarkers of risk in men. *Circulation.* 2012; 125: 1735–41.
- De Feo P, Perriello G, Torlone E, Ventura MM, Fanelli C, Santeusano F, Brunetti P, Gerich JE, Bolli GB. Contribution of cortisol to glucose counterregulation in humans. *Am J Physiol.* 1989;257(1 Pt 1):E35-42.
- De Feo P, Perriello G, Torlone E, Ventura MM, Santeusano F, Brunetti P, Gerich JE, Bolli GB. Demonstration of a role of growth hormone in glucose counterregulation. *Am J Physiol.* 1989;256(6 Pt 1):E835-43.
- Del Prato S. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabet Med.* 2009;26(12):1185-92.
- Dokken BB, Saengsirisuwan V, Kim JS, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(3):E615-21.
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005; 115: 1343–51.
- Drucker DJ. Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology.* 2001;142(2):521-7.

- Earle SR, O'Neal SG, Fisher RR. Chemical modification of mitochondrial transhydrogenase: evidence for two classes of sulfhydryl groups. *Biochemistry*. 1978;17(22):4683-90.
- Eccleston HB, Andringa KK, Betancourt AM, King AL, Mantena SK, Swain TM, Tinsley HN, Nolte RN, Nagy TR, Abrams GA, Bailey SM. Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(2):447-59.
- Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375(9733):2215-22.
- Ershow AG. Environmental influences on development of type 2 diabetes and obesity: challenges in personalizing prevention and management. *J Diabetes Sci Technol*. 2009;3(4):727-734.
- Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(7-8):1040-52.
- Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008; 134: 424-31.
- Fanelli C, Calderone S, Epifano L, De Vincenzo A, Modarelli F, Pampanelli S, Perriello G, De Feo P, Brunetti P, Gerich JE, et al. Demonstration of a critical role for free fatty acids in mediating counterregulatory stimulation of gluconeogenesis and suppression of glucose utilization in humans. *J Clin Invest*. 1993;92(4):1617-22.
- Fava E, Dehghany J, Ouwendijk J, Müller A, Niederlein A, Verkade P, Meyer-Hermann M, Solimena M. Novel standards in the measurement of rat insulin granules combining electron microscopy, high-content image analysis and in silico modelling. *Diabetologia*. 2012;55(4):1013-23.
- Feingold KR, Grunfeld C. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *Introduction to Lipids and Lipoproteins*. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-2018.
- Fergusson G, Ethier M, Guévremont M, Chrétien C, Attané C, Joly E, Fioramonti X, Prentki M, Poitout V, Alquier T. Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Mol Metab*. 2014;3(9):848-54.
- Figueira TR. A word of caution concerning the use of Nnt-mutated C57BL/6 mice substrains as experimental models to study metabolism and mitochondrial pathophysiology. *Exp Physiol*. 2013;98(11):1643.
- Fisher-Wellman KH, Ryan TE, Smith CD, Gilliam LA, Lin CT, Reese LR, Torres MJ, Neuffer PD. A Direct Comparison of Metabolic Responses to High-Fat Diet in C57BL/6J and C57BL/6NJ Mice. *Diabetes*. 2016;65(11):3249-3261.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.

- Foster DO, Frydman ML. Brown adipose tissue: the dominant site of nonshivering thermogenesis in the rat. *Experientia Suppl.* 1978;32:147-51.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science.* 1997;275(5300):665-8.
- Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol.* 1999;19(5):3278-88.
- Freeman H, Shimomura K, Cox RD, Ashcroft FM. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a link between insulin secretion, glucose metabolism and oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 5):806-10.
- Fung TT, Malik V, Rexrode KM, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Sweetened beverage consumption and risk of coronary heart disease in women. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89: 1037-42.
- Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, Buzzigoli E, Sironi AM, Cersosimo E, Ferrannini E, DeFronzo RA. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology.* 2007; 133: 496-506.
- Gehrmann W, Elsner M, Lenzen S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β -cells. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12 Suppl 2:149-58.
- Gerich J, Cryer P & Rizza R. Hormonal mechanisms in acute glucose counterregulation: the relative roles of glucagon, epinephrine, norepinephrine, growth hormone and cortisol. *Metabolism* 1980; 29(Suppl. 1): 1164-1175.
- Gerich J. Physiology of glucagon. *Int Rev Physiol* 1981; 24: 244-275.
- Gerich JE, Schneider V, Dippe SE, Langlois M, Noacco C, Karam JH, Forsham PH. Characterization of the glucagon response to hypoglycemia in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1974;38(1):77-82.
- Gerich JE. Control of glycaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1993;7(3):551-86.
- Gerich JE. Lilly lecture 1988. Glucose counterregulation and its impact on diabetes mellitus. *Diabetes.* 1988;37(12):1608-17.
- Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell.* 2015;161(1):161-172.
- Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014; 103(2):137-49.
- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(5):367-77.
- Haentjens P, Massaad D, Reynaert H, Peeters E, Van Meerhaeghe A, Vinken S, Poppe K, Velkeniers B. Identifying non-alcoholic fatty liver disease among asymptomatic overweight and obese individuals by clinical and biochemical characteristics. *Acta Clin Belg.* 2009;64(6):483-93.
- Hager SR, Jochen AL, Kalkhoff RK. Insulin resistance in normal rats infused with glucose for 72 h. *Am J Physiol.* 1991;260(3 Pt 1):E353-62.
- Hanke S, Mann M. The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(3):519-34.

- Hansen HH, Feigh M, Veidal SS, Rigbolt KT, Vrang N, Fosgerau K. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development. *Drug Discov Today*. 2017;22(11):1707-1718.
- Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 2000; 49: 1751–1760.
- Hoek JB, Rydström J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem J*. 1988;254(1):1-10.
- Holst JJ. Glucagonlike peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone. *Gastroenterology*. 1994;107(6):1848-55.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
- Huang C, Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2015;16(1):924-49.
- Humphrey GF. The distribution and properties of transhydrogenase from animal tissues. *Biochem J*. 1957;65(3):546-50.
- International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas, International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 8th edition, 2017, <http://www.diabetesatlas.org>.
- Irie M, Sohda T, Iwata K, Kunitomo H, Fukunaga A, Kuno S, Yotsumoto K, Sakurai K, Iwashita H, Hirano G, Ueda SI, Yokoyama K, Morihara D, Nishizawa S, Anan A, Takeyama Y, Sakamoto M, Shakado S, Sakisaka S. Levels of the oxidative stress marker γ -glutamyltranspeptidase at different stages of nonalcoholic fatty liver disease. *J Int Med Res*. 2012;40(3):924-33.
- Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S, Tsukamoto K, in 't Veld P, Renström E, Schuit FC. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes*. 2005;54(7):2132-42.
- Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, Kuo LH, Chang CS, Su IJ, Chang CR, Tsai YS. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol*. 2012;32(2):309-19.
- Jornayvaz FR, Shulman GI. Diacylglycerol activation of protein kinase C ϵ and hepatic insulin resistance. *Cell Metab*. 2012;15(5):574-84.
- Kaiser N, Leibowitz G, Nesher R. Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2003 Jan;16(1):5-22).
- Kaiyala KJ, Morton GJ, Leroux BG, Ogimoto K, Wisse B, Schwartz MW. Identification of body fat mass as a major determinant of metabolic rate in mice. *Diabetes*. 2010;59(7):1657-66.
- Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2006;281(36):26602-14.
- Kaplan NO, Colowick SP, Neufeld EF, Ciotti MM. Pyridine nucleotide transhydrogenase. IV. Effect of adenylic acid on the bacterial transhydrogenases. *J Biol Chem*. 1953 Nov;205(1):17-29.
- Kasuga M. Insulin resistance and pancreatic β cell failure. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1756–1760.
- Katsuura G, Asakawa A, Inui A. Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides*. 2002;23(2):323-9.
- Kaul S, Xu H, Zabalawi M, Maruko E, Fulp BE, Bluemn T, Brzoza-Lewis KL, Gerelus M, Weerasekera R, Kallinger R, James R, Zhang YS, Thomas MJ, Sorci-Thomas MG. Lipid-Free Apolipoprotein A-I Reduces Progression of

- Atherosclerosis by Mobilizing Microdomain Cholesterol and Attenuating the Number of CD131 Expressing Cells: Monitoring Cholesterol Homeostasis Using the Cellular Ester to Total Cholesterol Ratio. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(11).
- Kiekens R, In 't Veld P, Mahler T, Schuit F, Van De Winkel M, Pipeleers D. Differences in glucose recognition by individual rat pancreatic B cells are associated with intercellular differences in glucose-induced biosynthetic activity. *J Clin Invest.* 1992;89(1):117-25.
- Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(1):27-38.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 2001;495(1-2):12-5.
- Krycer JR, Sharpe LJ, Luu W, Brown AJ. The Akt-SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(5):268-76.
- Krieger-Brauer HI, Kather H. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest.* 1992;89(3):1006-13.
- Lafontan M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab.* 2014;40(1):16-28.
- Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem.* 1997;272(17):11439-43.
- Leahy JL, Cooper HE, Deal DA, Weir GC. Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions. *J Clin Invest.* 1986;77(3):908-15.
- Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans.* 2008 ;36(Pt 3):343-7.
- Leung JH, Schurig-Briccio LA, Yamaguchi M, Moeller A, Speir JA, Gennis RB, Stout CD. Structural biology. Division of labor in transhydrogenase by alternating proton translocation and hydride transfer. *Science.* 2015;347(6218):178-81.
- Lonardo A, Sookoian S, Pirola CJ, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. *Metabolism.* 2016;65(8):1136-50.
- Maclean N, Ogilvie RF. Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes.* 1955;4(5):367-76.
- Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem.* 2000;276(24):21938-42.
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984;25(12):1277-94.
- Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després JP, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2010; 33: 2477–83.
- Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annu Rev Med.* 2016;67:103-17.
- Mattes RD. Fat taste and lipid metabolism in humans. *Physiol Behav.* 2005;86(5):691-7.
- McEvoy RC. Changes in the volumes of the A-, B-, and D-cell populations in the pancreatic islets during the postnatal development of the rat. *Diabetes.* 1981;30(10):813-7.
- McGarry J. Glucose-fatty acid interactions in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(3 Suppl):500S–504S.

- Meimaridou E, Goldsworthy M, Chortis V, Fragouli , Foster PA, Arlt W, Cox R, Metherell LA. NNT is a key regulator of adrenal redox homeostasis and steroidogenesis in male mice. *J Endocrinol.* 2018;236(1):13-28.
- Meimaridou E, Kowalczyk J, Guasti L, Hughes CR, Wagner F, Frommolt P, Nürnberg P, Mann NP, Banerjee R, Saka HN, Chapple JP, King PJ, Clark AJ, Metherell LA. Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nat Genet.* 2012;44(7):740-2.
- Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W, Reaven PD. Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(5):1223-30.
- Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(11):656-65.
- Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, McClain DA. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J.* 1990; 9(8):2409-13.
- Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):121-38.
- Myers MG Jr, Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White MF. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):10350-4.
- Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K, Holst JJ, Nauck MS, Ritzel R, Hübner M, Schmiegel WH. Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):1239-46.
- Navarro CDC, Figueira TR, Francisco A, Dal'Bó GA, Ronchi JA, Rovani JC, Escanhoela CAF, Oliveira HCF, Castilho RF, Vercesi AE. Redox imbalance due to the loss of mitochondrial NAD(P)-transhydrogenase markedly aggravates high fat diet-induced fatty liver disease in mice. *Free Radic Biol Med.* 2017;113:190-202.
- Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, Parada LF. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature.* 2003;426(6964):291-5.
- Nesher R, Cerasi E. Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes.* 2002;51 Suppl 1:S53-9.
- Newsholme P, Keane D, Welters HJ, Morgan NG. Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. *Clin Sci (Lond).* 2007 ;112(1):27-42.
- Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, Krause M, Carpinelli A, Curi R. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: a critical role for amino acids. *J Endocrinol.* 2012;214(1):11-20.
- Ni R, Cao T, Xiong S, Ma J, Fan GC, Lacefield JC, Lu Y, Le Tissier S, Peng T. Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med.* 2016;90:12-23.
- Nicholson A, Reifsnyder PC, Malcolm RD, Lucas CA, MacGregor GR, Zhang W, Leiter EH. Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant

- nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obesity* (Silver Spring). 2010;18(10):1902-5.
- Pacifico L, Anania C, Martino F, Cantisani V, Pascone R, Marcantonio A, Chiesa C. Functional and morphological vascular changes in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;52(5):1643-51.
- Panten U, Ishida H. Fluorescence of oxidized flavoproteins from perfused isolated pancreatic islets. *Diabetologia*. 1975;11(6):569-73.
- Pedersen A, Karlsson GB, Rydström J. Proton-translocating transhydrogenase: an update of unsolved and controversial issues. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(5):463-73.
- Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2014;510(7503):84-91.
- Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(2):165-9.
- Pi J, Qu W, Reece JM, Kumagai Y, Waalkes MP. Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. *Exp Cell Res*. 2003;290(2):234-45.
- Portillo-Sanchez P, Bril F, Maximos M, Lomonaco R, Biernacki D, Orsak B, Subbarayan S, Webb A, Hecht J, Cusi K. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(6):2231-8.
- Pralong WF, Bartley C, Wollheim CB. Single islet beta-cell stimulation by nutrients: relationship between pyridine nucleotides, cytosolic Ca²⁺ and secretion. *EMBO J*. 1990;9(1):53-60.
- Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1802-12.
- Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC. Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia*. 1983;24(5):366-71.
- Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2008;10 Suppl 4:32-42.
- Rampersaud E, Damcott CM, Fu M, Shen H, McArdle P, Shi X, Shelton J, Yin J, Chang YP, Ott SH, Zhang L, Zhao Y, Mitchell BD, O'Connell J, Shuldiner AR. Identification of novel candidate genes for type 2 diabetes from a genome-wide association scan in the Old Order Amish: evidence for replication from diabetes-related quantitative traits and from independent populations. *Diabetes*. 2007;56(12):3053-62.
- Ratzliff V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*. 2010;53(2):372-84.
- Rhee SG. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006;312(5782):1882-3.
- Ridker PM. LDL cholesterol: controversies and future therapeutic directions. *Lancet*. 2014;384(9943):607-617.
- Rizza RA, Cryer PE, Haymond MW, Gerich JE. Adrenergic mechanisms of catecholamine action on glucose homeostasis in man. *Metabolism*. 1980;29(11 Suppl 1):1155-63.
- Robertson CC, Rich SS. Genetics of type 1 diabetes. *Curr Opin Genet Dev*. 2018;50:7-16.

- Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, Walseth TF. Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin Invest.* 1992;90(2):320-5.
- Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med.* 2016;48:e219.
- Ronchi JA, Figueira TR, Ravagnani FG, Oliveira HC, Vercesi AE, Castilho RF. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radic Biol Med.* 2013;63:446-56.
- Ronchi JA, Francisco A, Passos LA, Figueira TR, Castilho RF. The Contribution of Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase to Peroxide Detoxification Is Dependent on the Respiratory State and Counterbalanced by Other Sources of NADPH in Liver Mitochondria. *J Biol Chem.* 2016;291(38):20173-87.
- Rorsman P, Renström E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 2003;46(8):1029-45.
- Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):320-44.
- Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* 1998;47(10):1562-9.
- Rutter GA, Pullen TJ, Hodson DJ, Martinez-Sanchez A. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. *Biochem J.* 2015; 466(2):203-18.
- Rutter GA. Visualising insulin secretion. The Minkowski Lecture 2004. *Diabetologia.* 2004; 47(11):1861-72.
- Rydström J, Hu X, Fjellström O, Meuller J, Zhang J, Johansson C, Bizouarn T. Domains, specific residues and conformational states involved in hydride ion transfer and proton pumping by nicotinamide nucleotide transhydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1365(1-2):10-6.
- Rydström J. Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenases. *Biochim Biophys Acta.* 1977;463(2):155-84.
- Rydström J. Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenase. Properties of proton-translocating and ATP-driven transhydrogenase reconstituted from synthetic phospholipids and purified transhydrogenase from beef heart mitochondria. *J Biol Chem.* 1979;254(17):8611-9.
- Rydström J. Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(5-6):721-6.
- Rydström, J, Hoek, J. B. & Ernster, L. In *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed.) vol. 13, pp. 51-88, Academic Press, New York. 1976.
- Sakhuja P. Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis? *World J Gastroenterol.* 2014;20(44):16474-9.
- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414(6865):799-806.
- Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32345-53.
- Santos LRB, Muller C, de Souza AH, Takahashi HK, Spéjel P, Sweet IR, Chae H, Mulder H, Jonas JC. NNT reverse mode of operation mediates glucose control of

- mitochondrial NADPH and glutathione redox state in mouse pancreatic β -cells. *Mol Metab.* 2017;6(6):535-547.
- Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A, Fischer E. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2004;279(8):6613-9.
- Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 2008;118(9):2992-3002.
- Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453-62.
- Schindhelm RK, Heine RJ, Diamant M. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007;30(9):e94.
- Scott PA, Farrell JP. Experimental cutaneous leishmaniasis. I. Nonspecific immunodepression in BALB/c mice infected with *Leishmania tropica*. *J Immunol.* 1981;127(6):2395-400.
- Scully T. Diabetes in numbers. *Nature.* 2012; 485(7398):S2-3.
- Seppälä-Lindroos A1, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3023–28.
- Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle.* 2011;10(11):1750-6.
- Shindo N, Fujisawa T, Sugimoto K, Nojima K, Oze-Fukai A, Yoshikawa Y, Wang X, Yasuda O, Ikegami H, Rakugi H. Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model. *J Hepatol.* 2010;52(6):903-12.
- Siesjö BK. Hypoglycemia, brain metabolism, and brain damage. *Diabetes Metab Rev.* 1988;4(2):113-44.
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011; 121: 2094–2101.
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 1991;352(6330):73-7.
- Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature.* 1995;377(6545):173-7.
- Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol.* 2012;57(3):642-54. Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med.* 2002;53:319-36.
- Taddeo EP, Laker RC, Breen DS, Akhtar YN, Kenwood BM, Liao JA, Zhang M, Fazakerley DJ, Tomsig JL, Harris TE, Keller SR, Chow JD, Lynch KR, Chokki M, Molkentin JD, Turner N, James DE, Yan Z, Hoehn KL. Opening of the mitochondrial permeability transition pore links mitochondrial dysfunction to insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Metab.* 2013;3(2):124-34.
- Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(19):2300-8.
- Thomas CC, Philipson LH. Update on diabetes classification. *Med Clin North Am.* 2015;99(1):1-16.

- Thurlby PL, Trayhurn P. The role of thermoregulatory thermogenesis in the development of obesity in genetically-obese (ob/ob) mice pair-fed with lean siblings. *Br J Nutr.* 1979;42(3):377-85.
- Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, Mijat V, Goldsworthy M, Moir L, Haynes A, Quarterman J, Freeman HC, Ashcroft FM, Cox RD. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia.* 2005;48(4):675-86.
- Turer AT, Hill JA, Elmquist JK, Scherer PE. Adipose tissue biology and cardiomyopathy: translational implications. *Circ Res.* 2012;111(12):1565-77.
- Turner MD, Arvan P. Protein traffic from the secretory pathway to the endosomal system in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 2000; 275(19):14025-30.
- Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology. *N Engl J Med.* 1971;285(8):443-9.
- Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med.* 2002;53:319-36.
- Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest.* 2012;122(1):4-12.
- Van De Winkel M, Pipeleers D. Autofluorescence-activated cell sorting of pancreatic islet cells: purification of insulin-containing B-cells according to glucose-induced changes in cellular redox state. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;114(2):835-42.
- Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(3):274-85.
- Verspohl EJ, Händel M, Ammon HP. Pentosephosphate shunt activity of rat pancreatic islets: its dependence on glucose concentration. *Endocrinology.* 1979; 105(5):1269-74.
- Vegiopoulos A, Müller-Decker K, Strzoda D, Schmitt I, Chichelnitskiy E, Ostertag A, Berriel Diaz M, Rozman J, Hrabe de Angelis M, Nüsing RM, Meyer CW, Wahli W, Klingenspor M, Herzig S. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science.* 2010;328(5982):1158-61.
- Vogel R, Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R. The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. *Neurosci Lett.* 1999;275(2):97-100.
- Wahren J, Felig P, Hagenfeldt L. Physical exercise and fuel homeostasis in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1978;14(4):213-22.
- Wang CH, Wang CC, Huang HC, Wei YH. Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes. *FEBS J.* 2013;280(4):1039-50.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-808.
- White MF. Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84(7):725-37.
- Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept.* 2002;107(1-3):63-9.
- Woerle HJ, Meyer C, Dostou JM, Gosmanov NR, Islam N, Popa E, Wittlin SD, Welle SL, Gerich JE. Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(4):E716-25.

- Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, Abdullah Z, Boege Y, Stemmer K, Ringelhan M, Simonavicius N, Egger M, Wohlleber D, Lorentzen A, Einer C, Schulz S, Clavel T, Protzer U, Thiele C, Zischka H, Moch H, Tschöp M, Tumanov AV, Haller D, Unger K, Karin M, Kopf M, Knolle P, Weber A, Heikenwalder M. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell*. 2014;26(4):549-64.
- Wong RJ, Ahmed A. Obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Disparate associations among Asian populations. *World J Hepatol*. 2014;6(5):263-73.
- World Health Organization (WHO). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consultation. Geneva (Switzerland): WHO Press; 2006.
- World Health Organization (WHO). Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in diagnosis of diabetes mellitus: abbreviated report of a WHO consultation. WHO Press. 2011.
- World Health Organization (WHO). Global Health Observatory (GHO) data: Obesity. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/.
- Yamaguchi M, Hatefi Y, Trach K, Hoch JA. The primary structure of the mitochondrial energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenase deduced from the sequence of cDNA clones. *J Biol Chem*. 1988;263(6):2761-7.
- Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(11):901-10.
- Yki-Järvinen H. Pathophysiology of type 2 diabetes. In: Wass JAH, Stewart PM, eds. *Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes*. Oxford: Oxford University Press, 2011: pp 1740–48.
- Yin F, Sancheti H, Cadenas E. Silencing of nicotinamide nucleotide transhydrogenase impairs cellular redox homeostasis and energy metabolism in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817(3):401-9.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50230-6.
- Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, Madeo F. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*. 2012;15(3):279-91.
- Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(4):379-86.
- Zhang, C. Fang, X. Li et al., "Clinical characteristics and risk factors of diabetic peripheral neuropathy of type 1 diabetes mellitus patients," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 129, pp. 97–104, 2017.
- Zhang D, Liu ZX, Choi CS, Tian L, Kibbey R, Dong J, Cline GW, Wood PA, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:17075–17080.
- Zhao L, Zhong S, Qu H1, Xie Y, Cao Z, Li Q, Yang P, Varghese Z, Moorhead JF, Chen Y, Ruan XZ. Chronic inflammation aggravates metabolic disorders of hepatic fatty acids in high-fat diet-induced obese mice. *Sci Rep*. 2015;5:10222.
- Zheng Y, Ley SH, Hu FB2. Global etiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(2):88-98.

Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med.* 2000;6(8):924-8.

Anexo 01



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo das alterações do metabolismo glicídico e lipídico em camundongos C57BL/6 com deficiência da transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida mitocondrial (NNT)" (protocolo nº 3472-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira / Juliana Cristine Rovani Rodrigues, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 03 de novembro de 2014.

Campinas, 03 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Anexo 02**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Papel da transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida (NNT) mitocondrial no metabolismo glicídico e no metabolismo lipídico**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 16 de Outubro de 2018

Assinatura : Juliana C. Rovani Rodrigues

Nome do(a) autor(a): **Juliana Cristine Rovani Rodrigues**

RG n.º 43.569.276-8

Assinatura : Helena Coutinho Franco de Oliveira

Nome do(a) orientador(a): **Helena Coutinho Franco de Oliveira**

RG n.º 7.563.630-X