

## Butafosfan altera um indicador de atividade de células $\beta$ pancreáticas e concentração de glicose sérica em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hipercalórica

MARIA AMÉLIA AGNES WEILLER<sup>1,2</sup>; JOAO ALVARADO RINCÓN<sup>1</sup>, CAROLINA BESPALHOK JACOMETO<sup>1,3</sup>; LUCAS HAX<sup>1</sup>, MÁRCIO NUNES CORRÊA<sup>1</sup>, FRANCISCO BURKERT DELPINO<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária  
Universidade Federal de Pelotas – UFPel  
Campus Universitário – 96010 900

<sup>3</sup>Programa de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá DC, Colombia

<sup>2</sup>[mariaamelia.weiller@hotmail.com](mailto:mariaamelia.weiller@hotmail.com), <sup>4</sup>[fabdelpino@gmail.com](mailto:fabdelpino@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O fósforo desempenha papel importante em diversos processos biológicos, sendo necessário nas reações enzimáticas, especialmente as relacionadas ao metabolismo energético (RAINHA et al., 2012). No metabolismo hepático de carboidratos, o fósforo tem papel importante na rota gliconeogênica, uma vez que intermediários deste processo precisam ser fosforilados, sendo que a taxa de gliconeogênese e glicólise são reguladas pela disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi) (BERG et al., 2006).

Estudo realizado com ratos demonstrou que o fósforo está também relacionado a esteatose hepática, uma vez que a restrição de Pi aumentou de maneira significativa o acúmulo de lipídeos no fígado de animais alimentados com uma dieta contendo 2% de colesterol (TANAKA et al., 2013). Outro estudo realizado em ratos submetidos a dieta de alta energia e diferentes níveis de inclusão de fósforo demonstrou que os animais com menores concentrações do mineral na dieta apresentaram significativa perda de peso, queda na ingestão e déficit energético, mas não observaram o desenvolvimento de esteatose hepática (ELHALABI, 2014).

Fonte orgânica de fósforo, o butafosfan, quimicamente conhecido como 1-butilamino-1-metil ácido etilfosfórico, é um derivado do ácido fosfórico capaz de fornecer íons fosfato, essenciais para a catálise de várias reações celulares, como as reações de síntese de energia (DENIZ, 2008; GONZÁLEZ e SILVA, 2006). A oferta de Pi, garantida pelo butafosfan, tem a capacidade de estimular o metabolismo gliconeogênico, assim como de manter a integridade do tecido e o correto funcionamento hepático (CUTERI, 2008).

Apesar dos avanços já obtidos nas pesquisas com a utilização de diferentes fontes de fósforo em diversas espécies, ainda é necessário esclarecimento dos efeitos e mecanismos pelos quais o butafosfan age no metabolismo. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do butafosfan sobre a deposição de tecido adiposo, peso hepático, concentrações séricas de glicose e insulina, assim como estimar a funcionalidade de células  $\beta$  pancreáticas e o grau de sensibilidade à insulina em camundongos alimentados com uma dieta hipercalórica.

## 2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas sob registro número 6936.

Foram alojados no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, durante dez semanas, 14 camundongos machos, da linhagem C57BL/6, com 90 dias de idade. Os animais permaneceram dentro de caixas próprias para a criação de camundongos, sob um regime de 12 horas/luz. A temperatura do ambiente foi controlada e mantida em 22°C, em média.

A dieta hipercalórica ofertada aos animais era constituída por: 68% de ração Nuvilab® (Nuvital, Brasil), 26% de leite condensado, 1% de amido de milho, 5% de óleo vegetal e 2,5% de água. A ração hipercalórica foi modelada em formato de “pellets”, e posteriormente seca em forno a 50°C, durante um período de 4 horas. As rações foram preparadas a cada dois dias afim de sempre estarem frescas, impedindo assim deteriorações. Alíquotas de todas as amostras ofertadas aos animais foram armazenadas em freezer -20°C para que fossem, posteriormente, encaminhadas ao laboratório para análise da composição bromatológica.

Os animais foram distribuídos em dois grupos, grupo butafosfan e grupo controle, com sete animais cada, sendo-lhes fornecido, durante todo período experimental, água e ração hipercalórica *ad libitum*. No início da 10ª semana, os animais do grupo butafosfan e grupo controle passaram a receber, respectivamente, aplicações de butafosfan (50mg/Kg), via subcutânea, em intervalos de 12 horas, ou solução salina. Após as 10 semanas de tratamento, realizou-se eutanásia, onde os animais foram previamente anestesiados com anestesia inalatória Halotano (Cristália, Brasil), seguida de decapitação. Realizou-se coleta de sangue diretamente da região cervical em tubos eppendorff sem anticoagulante, os quais foram mantidos em gelo até a centrifugação. Fígado e tecido adiposo epididimal foram coletados e pesados.

Para determinação da Insulina, utilizou-se kit comercial Rat/Mouse Insulin ELISA kit (EMD Millipore Corporation, Alemanha), conforme instruções do fabricante. As concentrações de glicose, avaliadas utilizando-se kit comercial Glicose Liquiform (Labtest diagnóstica S.A., Brasil), em analisador colorimétrico automático Labmax Plenno (Labtest diagnóstica, Brasil). A partir dos resultados obtidos de glicose e insulina, estimou-se a atividade de células β pancreáticas (%B) e sensibilidade à insulina (%S) através de software HOMA IR calculator (OXFORD UNIVERSITY, 2013).

Os resultados foram submetidos a teste t para amostras não pareadas em software Graph Pad Prism 5. Ainda, realizou-se análises de correlação entre os dados. Considerou-se valores significativos quando  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados são resultados parciais de dados obtidos durante a realização do mestrado do primeiro autor.

Observou-se que animais tratados com butafosfan apresentaram maiores concentrações de glicose séricas ( $p=0,04$ ) quando comparado àqueles que receberam a solução salina (Tabela 1). Isto pode ser explicado em razão do fósforo apresentar papel importante no metabolismo hepático de carboidratos, uma vez que na via gliconeogênica muitos intermediários precisam ser fosforilados (BERG et al., 2006). O mesmo resultado foi encontrado em estudo

realizado em vacas leiteiras, onde animais tratados com butafosfan associado a cianocobalamina apresentaram maiores concentrações de glicose quando comparados ao controle (DENIZ et al, 2008). Já NUBER (2015) e PEREIRA (2013) não observaram diferenças nas concentrações de glicose séricas em bovinos e ovinos, respectivamente. Em seu estudo, NUBER (2015) comenta que o butafosfan pode ter estimulado a glicólise em decorrência dos maiores níveis de glucagon séricos encontrados no grupo tratado.

**Tabela 1.** Composição corporal e marcadores sanguíneos relacionados ao metabolismo energético em camundongos tratados com butafosfan ou controles.

	<u>Grupos</u>		<u>Valor de p</u>
<b>Peso corporal (g)</b>	Butafosfan	33,29±1,5	34,8±1,7
<b>Tecido Adiposo (g)</b>	Butafosfan	0,88±0,10	0,94±0,10
<b>Tecido Hepático (g)</b>	Butafosfan	1,57±0,03	1,74±0,09
<b>Glicose</b>	Butafosfan	12,36±0,18	11,83±0,09
<b>Insulina</b>	Butafosfan	50,63±1,8	53,70±3,36
<b>HOMA IR</b>	Butafosfan	1,18±0,03	1,20±0,07
<b>%S</b>	Butafosfan	85,27±2,6	85,34±7,13
<b>%B</b>	Butafosfan	15,8±0,9	20,31±1,37

Valores estão representados pela média ± desvio padrão da media. Dados foram analisados pelo teste “t” de Student.

No presente estudo, observou-se que animais que receberam a aplicação do butafosfan apresentaram menor atividade de células  $\beta$  pancreáticas ( $p=0,01$ ) quando comparados ao grupo que recebeu solução salina. As células  $\beta$  pancreáticas estão localizadas nas Ilhotas de Langerhans e são responsáveis pela produção de insulina (VETERE, 2014), sendo este um hormônio peptídico que regula as concentrações de glicose séricas através do controle de captação de glicose pelas células corporais, atuando ainda no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos (WILCOX, 2005). Desta forma, as células  $\beta$  pancreáticas estão também relacionadas a manutenção da homeostase de glicose, sendo que a preservação da funcionalidade destas células é imprescindível para o status metabólico do organismo (VETERE, 2014).

Apesar de não ter sido observada diferença estatística nas concentrações de insulina entre os grupos, os animais tratados com butafosfan apresentaram menores concentrações, vindo ao encontro dos resultados para atividade de células  $\beta$  pancreáticas e glicose sérica. Essa afirmação se embasa no fato de que havendo redução da atividade destas células, há menor síntese de insulina e consequentemente maiores concentrações de glicose circulantes (WILCOX, 2005). Cabe destacar que ainda é prematuro afirmar que o butafosfan diminui a funcionalidade das células  $\beta$  pancreáticas, pois a atividade destas células ainda poderia estar reduzida em função do estímulo da rota gliconeogênica pelo butafosfan. KREIPE et al (2011), observou uma maior expressão hepática de genes relacionados ao processo de  $\beta$  oxidação, sendo este o processo pelo qual o ácido graxo é convertido em acetil CoA para entrar no ciclo de Krebs e sintetizar glicose.

Em nosso estudo não observamos diferença no índice HOMA, entre os grupos, assim como não se observou diferenças no peso do tecido hepático, sugerindo desta forma que o butafosfan não interfere no processo de sensibilidade à insulina. O peso corporal e tecido adiposo epididimal também não foram diferentes.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o butafosfan não interfere na sensibilidade hepática à insulina, não altera o peso hepático, peso vivo e quantidade de tecido adiposo epididimal, mas pode ter influência sobre a atividade de células  $\beta$  pancreáticas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERG JM, TYMOCZKO JL e STRYER L. Glycolysis and gluconeogenesis. **Biochemistry**, 6th edition, p. 433–474, 2006.
- CUTERI V, NISOLI L, ATTILI AR, ROMERO TEJADA A, PREZIOSO S, FRUGANTI A. Clinical Field evaluation of a butafosfan + vitamin B12 compound in the treatment of subclinical ketosis in dairy cows. In: **XXVTH WORLD BUIATRICS CONGRESS**. 2008.
- DENIZ, A., WESTPHAL, B. e ILLING, C. Effects of prepartum metaphylactic treatment with Catosal on postpartum metabolic functions in cows. In: **25th WORLD BUIATRICS CONGRESS**. 2008.
- ELHALABI, Mariam Mohammad Ali. **The role of phosphorus in the development and progression of high fat diet induced NAFLD in rats**. Tese de Doutorado 2014. American University of Beirut. Department of Nutrition and Food Science.
- FARESE, R. V., ZECHNER, R., NEWGARD, C. B., & WALTHER, T. C. The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. **Cell metabolism**, v.15, n.5, p.570-573. 2012.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C.; **Introdução à Bioquímica Veterinária**; Editora da UFRGS; 2ª Edição, 2006.
- KREIPE, L., DENIZ, A., BRUCKMAIER, R. M., & VAN DORLAND, H. A. First report about the mode of action of combined butafosfan and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. **Journal of dairy science**, 94(10), 4904-4914. 2011.
- MASUDA, M., ... e TAKEDA, E. Dietary phosphate restriction induces hepatic lipid accumulation through dysregulation of cholesterol metabolism in mice. **Nutrition Research**, v.33, n.77, p.586-593. 2013.
- NUBER, U., DORLAND, H.A., e BRUCKMAIER, R.M. Effects of butafosfan with or without cyanocobalamin on the metabolism of early lactating cows with subclinical ketosis. **Journal of animal physiology and animal nutrition**. v.100, p.146-155. 2015.
- PEREIRA, Rubens Alves et al. Metabolic parameters and dry matter intake of ewes treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period. **Small Ruminant Research**, v. 114, n. 1, p. 140-145, 2013.
- RAINAS, R., GARG, G., SETHI, S. K., SCHREIBER, M. J., & SIMON, J. F. Phosphorus Metabolism. **Journal Nephrology and Therapeutics**, v.3, p.2161-0959. 2012.
- TANAKA, S., YAMAMOTO, H., NAKAHASHI, O., KAGAWA, T., ISHIGURO, M., VETERE, A., CHOUDHARY, A., BURNS, S. M., & WAGNER, B. K. Targeting the pancreatic  $\beta$ -cell to treat diabetes. **Nature reviews** 13(4), 278-289. 2014.
- WILCOX, Gisela. Insulin and insulin resistance. **Clinic Biochemical Review**, v. 26, n. 2, p. 19-39, 2005.