

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**GRAZIELA RENATA STOPPA**

**Administração central de citrato  
modula a homeostase periférica da  
glicose em ratos Wistar.**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Graziela Renata Stoppa*  
*[Assinatura]*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada ao  
Instituto de Biologia para  
obtenção do título de  
Doutor em Biologia  
Funcional e Molecular na  
área de Bioquímica**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MARCIO ALBERTO TORSONI  
Co-ORIENTADOR: PROF. DR. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO**

**CAMPINAS  
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

<b>St73a</b>	<p>Stoppa, Graziela Renata Administração central de citrato modula a homeostase periférica da glicose em ratos <i>wistar</i> / Graziela Renata Stoppa. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Marcio Alberto Torsoni. Co-orientador: Licio Augusto Velloso. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Citratos. 2. Hipotálamo. 3. Tecido adiposo. 4. Músculo esquelético. I. Torsoni, Marcio Alberto. II. Velloso, Licio Augusto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

**Título em inglês:** Intracerebroventricular injection of citrate modulates feeding behavior and glucose uptake in epididymal fat pad and skeletal muscle of rat.

**Palavras-chave em inglês:** Citrates; Hypothalamus; Adipose tissue; Skeletal muscle.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Marcio Alberto Torsoni, Fernanda Alvarez Rojas, Fernanda Ramos Gadelha, Patrícia da Silva Melo, Eliana Pereira de Araújo.

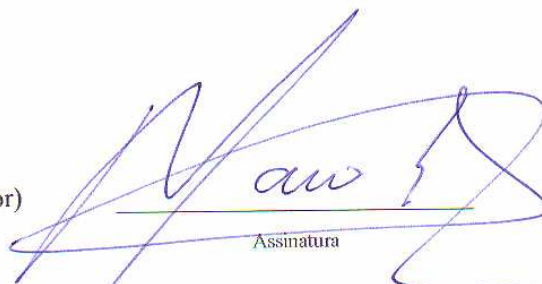
**Data da defesa:** 20/08/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, .....20..... de .....08..... de .....2007

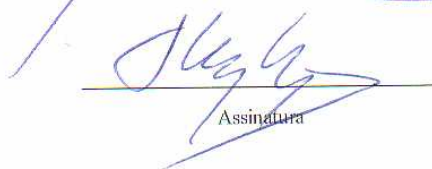
**BANCA EXAMINADORA**

Prof(a). Dr(a). Marcio Alberto Torsoni. (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Alvarez Rojas.



Assinatura

Prof(a). Dr(a). Fernanda Ramos Gadelha.



Assinatura

Prof(a). Dr(a). Patrícia da Silva Melo



Assinatura

Prof(a). Dr(a). Eliana Pereira de Araujo



Assinatura

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

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Hiroshi Ayoama

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Eliana Beraldi Ribeiro

Assinatura

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni pela orientação, paciência, incentivo, correções e discussões deste trabalho. Agradeço, sobretudo, pela amizade e pelo carinho despendido durante nossa convivência desde a iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Licio Augusto Velloso pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, pelas discussões, pelos conhecimentos compartilhados e pela pronta disposição em me ajudar durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario J. A. Saad por disponibilizar o laboratório para a execução do presente trabalho e pela agradável convivência.

Aos professores Dra. Fernanda Ramos Gadelha, Dra. Patrícia da Silva Melo, Dra. Eliana Pereira de Araújo, Dra. Fernanda Alvarez Rojas, Dr. Hiroshi Aoyama, Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira e Dra. Eliane Beraldi Ribeiro, pelas importantes contribuições nas bancas prévia e definitiva.

Aos técnicos Sr. Luís, Sr. Jósimo, Marcio, Davi, Sr. José e Luís pelo apoio técnico.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica pela amizade e colaboração.

À Andréia, secretária da pós-graduação, pela disposição e amizade durante todos estes anos.

À CAPES pelo apoio através da bolsa concedida durante o doutorado.

À todos os amigos e colegas do laboratório pelos momentos de descontração e pelas discussões científicas, principalmente ao Eli, um amigo que contarei para sempre.

À Patrícia Prada pela ajuda nos experimentos de clamp.

À Adriana e Joseane pela ajuda e discussões referentes à realização dos RT-PCR.

À Ellen pela ajuda nas fotos do RT-PCR.

Às alunas de iniciação científica Vanessa e Viviane pelas colaborações nos experimentos.

À Érika pela amizade, força e colaboração na fase inicial deste trabalho.

Às minhas queridas amigas Adriana, Kellen, Talita pela ajuda durante a resolução deste trabalho, pelas conversas animadas e por compartilharem das minhas alegrias.

À Mari, minha grande amiga, pela comunhão no trabalho e na vida pessoal, amiga que sempre fez e faz tudo parecer mais fácil e leve.

À minha amada família, que tanta falta me faz, que mesmo à distância, sempre me deu força, amor e compreensão. Meus pais (Dina e Alfeu) minha eterna inspiração.

Ao Paulo, por sempre me apoiar e me fazer rir nos momentos difíceis, me sentir segura quando mais preciso. Te amo.

À Deus, por ter tantas pessoas maravilhosas em meu caminho.

## Índice

<b>Introdução</b>	01
<b>Materiais e Métodos</b>	17
1) Animais Experimentais	17
2) Cirurgia Estereotáxica	17
3) Protocolo para Tratamento com Drogas	18
3.1) Tratamento com Citrato	18
3.2) Tratamento com ARA-A	19
3.3) Tratamento com Insulina	19
4) Dosagem de glicogênio muscular	19
4.1) Método de dosagem de glicogênio	20
4.2) Avaliação do efeito do citrato na ingestão alimentar de ratos em jejum	20
5) Medidas bioquímicas e hormonais	21
6) Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT)	21
7) Clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico	22
7.1) Análise da captação de 2- [ <sup>3</sup> H] deoxiglicose (2DG) pelo músculo esquelético e pelo tecido adiposo epididimal	24
8) Fracionamento subcelular	24
9) Extração de Tecidos	25
9.1) Imunoprecipitação	26
9.2) Imunoblot	26
10) Análise por RT-PCR	27
10.1) Extração de RNA do Hipotálamo	27
10.2) Reação de transcrição reversa	28

10.3) Reações de Amplificação	29
11) Análises Estatísticas	30
<b>Resultados</b>	31
1) Efeito do citrato e do ARA-A na ingestão alimentar, na fosforilação da AMPK e da ACC hipotalâmicas	31
1.1) Ingestão alimentar	31
1.2) Fosforilação da AMPK e da ACC Hipotalâmicas	31
2) Efeito do citrato na ingestão alimentar e na ativação da AMPK hipotalâmica de animais mantidos em jejum prévio	31
2.1) Avaliação da ingestão alimentar	32
2.2) Avaliação da fosforilação da AMPK hipotalâmica	32
3) Efeito do tratamento com citrato na ingestão alimentar, no ganho de peso e na adiposidade corpórea	32
4) Efeito do citrato na expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos	33
5)- Efeito do citrato (ICV) na concentração de insulina no sangue e nos níveis de corticosterona no plasma	33
6) Efeito do citrato na captação de glicose	34
6.1) Teste de Tolerância à Glicose (GTT)	34
7) Clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico	34
7.1) Efeito do citrato na captação de glicose pelo organismo e na taxa de infusão de glicose	34
7.2) Efeito do citrato na captação de 2 [ <sup>3</sup> H]-deoxiglicose pelo tecido epididimal e pelo músculo esquelético	34
8) Expressão de GLUT4	35
8.1) No tecido adiposo epididimal	35
8.2) No músculo esquelético	35
9) Dosagem do nível de glicogênio muscular	36

10) Efeito do citrato na ativação da AMPK e ACC	36
10.1) Fosforilação da AMPK e ACC no tecido adiposo epididimal	36
10.2) Fosforilação da AMPK e ACC no músculo estriado esquelético ( <i>soleus</i> )	37
11) Avaliação da transdução do sinal da insulina após tratamento com citrato	37
11.1) Transdução do sinal da insulina no tecido adiposo epididimal	37
11.2) Transdução do sinal da insulina no músculo estriado esquelético ( <i>soleus</i> )	39
<b>Figuras</b>	40
<b>Discussão</b>	54
<b>Conclusão</b>	64
<b>Referências Bibliográficas</b>	65



## Lista de Abreviaturas

ACC	Acetil-CoA Carboxilase
AgRP	Proteína relacionada ao gene agouti
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	AMPcíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AMPKK	Quinase da AMPK
APS	Proteína adaptadora de domínios PH e SH <sub>2</sub>
ARA-A	Adenina 9-β-D-arabinofuranosídeo
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATGL	“Adipose triglyceride lipase”
CAMKK	Quinase da proteína quinase dependente de Ca <sup>+2</sup> - calmodulina
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase 1
CRE	Elemento responsivo ao AMPc
CREB	Proteína ligadora de elemento responsivo ao AMPc
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DTT	Ditiotreitol
ERK	Quinase regulada extracelular
GLUT	Transportador de glicose
GS	Glicogênio Sintase
HSL	Lipase Sensível à Hormônios
ICV	Intracerebroventricular

IP	Intraperitoneal
IpGTT	Teste de tolerância à glicose intraperitoneal
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato para o receptor de insulina
IV	Intravenoso
JAK 2	Janus Kinase 2
LHA	Área lateral hipotalâmica
LKB1	Quinase mutada do gene da síndrome Peutz-Jegher (PJS)
MCD	Malonil-CoA descarboxilase
NPY	Neuropeptídeo Y
ObR	Receptor da leptina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKB	Serina/treonina proteína quinase B
PP2C	Proteína fosfatase 2C
POMC	Proopiomelanocortina
PtdIns (3,4,5)P3	Fosfatidilinositol 3,4,5, trifosfato
PVN	Núcleo paraventricular
RNAm	RNA mensageiro
RPS29	Proteína S29 da subunidade ribossomal
RT-PCR	Reação transversa da polimerase em cadeia
Ser	Serina
STAT3	Sinal transdutor e ativador da transcrição 3
Thr	Treonina
VMH	Hipotálamo ventromedial

## **Resumo**

O hipotálamo desempenha importante papel na manutenção da homeostase da glicose. Robustos sinais originados pela leptina e insulina agem coordenando a ingestão alimentar, o gasto energético e o metabolismo periférico. No hipotálamo e nos tecidos periféricos, a AMPK é um sensor energético que regula o metabolismo celular através do controle entre a produção e consumo de ATP. Ela é inibida em resposta à insulina, leptina e na presença de disponibilidade de nutrientes. O citrato é conhecido como um modulador de algumas enzimas, como a fosfofrutoquinase e acetil-CoA carboxilase. Neste estudo a hipótese do citrato modular enzimas relacionadas com controle da saciedade e do metabolismo periférico foi testada. Primeiramente, foi mostrado que o citrato intracerebroventricular inibe a fosforilação do sistema AMPK/ACC, diminui a ingestão alimentar, promove a perda de peso, aumenta a expressão de neuropeptídeos anorexigênicos (POMC e CRH) e diminuiu o tecido adiposo epididimal e perirenal. O *clearance* da glicose avaliado pelo clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico e GTT foi maior em animais tratados previamente com citrato, bem como ocorreu maior captação de glicose pelo adiposo e pelo músculo esquelético. Corroborando com o efeito do citrato na homeostase da glicose, a fosforilação de IR, IRS1, IRS2 e AKt avaliada por imunoblotting foi maior, em ambos os tecidos, nos animais que receberam previamente o citrato via ICV. A translocação do GLUT para a membrana plasmática também foi potencializada pelo tratamento prévio com citrato via ICV, tanto no tecido adiposo epididimal como no tecido muscular. Por outro lado, a AMPK no músculo esquelético e no adiposo não foi ativada por citrato ICV, descartando seu efeito na captação de glicose. Nós concluímos que o citrato pode participar com um indicador do estado energético nos neurônios e, portanto, modular o comportamento alimentar, captação de glicose e metabolismo periférico.

## **Abstract**

Hypothalamic neurons display important role in the glucose homeostase. Robust signals from leptin and insulin act coordinating the food intake, energy expenditure and peripheral metabolism. In the hypothalamus and peripheral tissue the AMPK is an energy sensor that regulates cellular metabolism through its sensitivity to the cellular energy status. It is inhibited in response to insulin, leptin and nutrients availability. The citrate is well known as a modulator of some enzymes, such as phosphofructokinase and acetyl-CoA carboxilase. Here, we hypothesized that citrate participates of neuronal feeding control and glucose homeostasis. Firstly, we show that intracerebroventricular citrate inhibits AMPK/ACC phosphorylation. In addition, we show that citrate also decreases food intake, promotes weight loss, increases the expression of anorexigenic neuropeptides (POMC and CRH) and increases the epididymal fat pad and perirenal adipose tissue. Glucose clearance evaluated by hyperinsulinemic-euglycemic clamp and GTT was increased in animals treated previously with citrate, as well as adipose and skeletal muscle tissue glucose uptake. Corroborating the effect of the citrate on the glucose homeostase, IR, IRS2, IRS1 and AKt phosphorylation evaluated by immunoblotting was improved by citrate treatment in both tissues, as well as GLUT4 location in the membrane compartment. On the other hand, AMPK in the skeletal muscle and adipose tissue was not activated by citrate ICV injection discarding their effect on the glucose uptake. We concluded that citrate could be an indicator regarding to energy status of the neuron. This in turn changes the neuropeptides expression to modulate feeding behavior, glucose uptake and peripheral metabolism.

## **INTRODUÇÃO**

Na sociedade moderna a obesidade é o distúrbio nutricional mais comum e está associada com altas taxas de mortalidade e à doenças crônicas, tais como as doenças cardiovasculares (Cascella et. 2006; Orio et al. 2007), a hipertensão arterial (Reddy et al. 2006), a hipercolesterolemia, as dislipidemias, alguns tipos de câncer (Guallar-Castilón et al. 2002) e o diabetes mellitus (Moller, 2001; Kahn & Flier, 2000; Friedman, 2000).

A obesidade é decorrente de um desequilíbrio no balanço energético, onde a ingestão calórica é maior que o gasto de energia. Nesta equação fatores importantes devem ser considerados, tais como: a manutenção da taxa metabólica basal, a atividade física, o crescimento e a termogênese (Dulloo, 1998).

De acordo com Mattsson et al. (2007) a incidência da obesidade vem crescendo de forma alarmante no mundo e este crescimento tem sido acompanhado pelo aumento dos casos de diabetes. Nas duas últimas décadas a incidência de diabetes na população mundial aumentou significativamente. Atualmente, o número de diabéticos no mundo é de cerca de 177 milhões de indivíduos de acordo com o estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Também de acordo com este estudo, em 2025 o número de indivíduos diabéticos estará próximo de 350 milhões. Este estudo gera um senso de urgência na compreensão dos mecanismos que controlam a ingestão calórica e a homeostase da glicose (Kahn & Flier, 2000; Moller, 2001; Friedman, 2000; Obici & Rossetti, 2003; Nguyen & Hsu, 2007).

Na sociedade moderna fatores como a alta disponibilidade de nutrientes

calóricos e o baixo gasto energético decorrente de sedentarismo, associado às características genéticas e bioquímicas, que permitem o armazenamento de energia na forma de lipídios, contribuem para os índices que apontam para o crescimento da obesidade no mundo.

O aumento na disponibilidade de nutrientes e energia é monitorado por mecanismos sensíveis constituídos por hormônios, neuropeptídeos e pelo metabolismo celular. Através destes mecanismos a célula modula a captação e a utilização dos diferentes nutrientes energéticos (Air et al. 2002; Wilding, 2002). No sistema nervoso central os sinais hormonais, nutricionais e neurais periféricos, que indicam o estado nutricional, são monitorados por várias regiões do cérebro, notavelmente o hipotálamo (Mercer & Speakman, 2001).

Os neurônios encontrados no hipotálamo estão agrupados em núcleos, tais como o núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN) e área hipotalâmica lateral (LHA), que desempenham importante papel na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético. Estes núcleos apresentam diferenças bioquímicas e funcionais importantes que estão relacionadas com a função que desempenham no sistema nervoso central. O ARC produz tanto neuropeptídeos orexigênicos (estimulam o apetite), como anorexigênicos (inibem o apetite) que são enviados a LHA e ao PVN por densas projeções neurais. O PVN é um núcleo heterogêneo ricamente suprido por projeções de axônios do ARC e da LHA. O LHA é o centro da fome, pois estímulos nesta área promovem aumento da ingestão de alimentos, enquanto sua destruição atenua a fome e causa perda de peso (Mercer & Speakman, 2001). Dentro do cérebro há também regiões que participam diretamente nas flutuações nos níveis de glicose circulante, como a

região hipotalâmica ventromedial (VMH), rica em neurônios sensíveis à glicose. Recentes pesquisas demonstram que lesões no VMH levam a hiperfagia e a obesidade em várias espécies, incluindo a humana (McCrimmon et al., 2006). Os centros nervosos do hipotálamo respondem aos sinais do estado nutricional periférico, com liberação de neuropeptídeos que regulam a ingestão alimentar e o gasto energético. NPY (neuropeptídeo Y) e AgRP (*agouti-related transcript*) são neuropeptídeos orexigênicos, enquanto POMC (*pro-opiomelanocortin*), CART (*cocaine-amphetamine-related transcript*) e CRH (*corticotropin-releasing hormone*) são neuropeptídeos anorexigênicos (Baskin et al., 2000). A expressão destes neuropeptídeos nos diferentes núcleos hipotalâmicos é modulada por sinais hormonais de diferentes origens. Como exemplo, destes sinais podemos citar a leptina, produzida pelo tecido adiposo, a grelina, um peptídeo gástrico orexigênico, os polipeptídeos do trato gastrointestinal e a insulina (Spiegelman & Flier 2001; Niswender & Schwartz, 2003).

Em adição aos efeitos promovidos por hormônios, o hipotálamo também responde a sinais nutricionais através de neurônios responsivos às mudanças na concentração de glicose (*glucose-excited neurons* e *glucose-inhibited neurons*) circulante como já citado acima (Song, 2001). Entretanto, a densidade energética alimentar e a regulação hormonal a curto prazo não são suficientes para produzir alterações sustentáveis no balanço energético e na adiposidade corpórea. Estes sinais então, interagem com os reguladores de longo prazo, isto é, insulina, leptina e possivelmente com a grelina, para manter a homeostase energética do organismo (Havel, 2001).

Dentro dos reguladores da homeostase energética de longo prazo, a

insulina é fundamental, pois ela é o mais potente hormônio anabólico identificado até hoje. Ela é produzida e secretada pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas e praticamente todas as células são responsivas à insulina, embora o termo “tecidos sensíveis à insulina” seja utilizado freqüentemente para o fígado, tecido adiposo e músculo (Cheng et al., 2002).

O efeito primário da insulina é manter a homeostase da glicose, através da captação da mesma pelo músculo e pelo tecido adiposo, enquanto inibe a produção de glicose hepática. A insulina também estimula a lipogênese, a síntese protéica, e tem demonstrado ser mitogênica para alguns tipos de células (Cheng et al., 2002).

Os eventos decorrentes da presença de insulina dependem de um complexo sistema de ativação de proteínas citosólicas e de membrana (Esquema 1). Estes eventos se iniciam com a ligação da insulina ao seu receptor IR, que é composto de duas subunidades extracelulares ( $\alpha$ ) e duas subunidades transmembranas ( $\beta$ ) ligadas por pontes dissulfeto. A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  do IR induz à autofosforilação em tirosina da subunidade  $\beta$  (Cheng et al., 2002). O IR ativado fosforila os substratos do receptor de insulina (IRS1-4), e a proteína Shc (*Src homology collagen*). A Shc é substrato do receptor do fator de crescimento, um complexo componente chave na sinalização da insulina, que inclui a pequena G-protein RAS, que ativa 3 cascatas de quinases chegando às MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*), mediando assim, o efeito mitogênico da insulina (Lieskovska et al., 2006). Todas estas proteínas fosforiladas funcionam como moléculas efetoras capazes de ativar diferentes vias de sinalização celular.

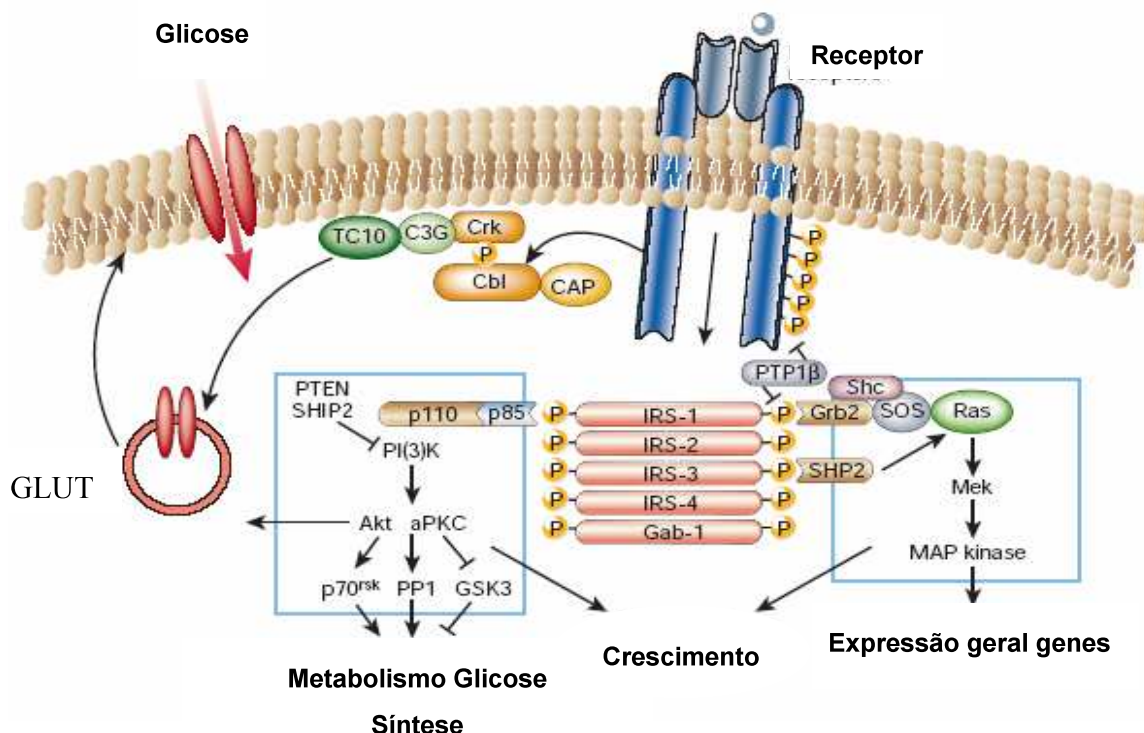


A via da PI3 quinase está preferencialmente envolvida em ações metabólicas da insulina, tais como síntese de lipídios e glicogênio, além da captação de glicose (Saltiel & Kahn, 2001). Essa última ação metabólica envolve 2 passos, o primeiro envolve produção de 3-fosfoinositídeos PtdIns (3,4) P<sub>2</sub> e PtdIns (3,4,5) P<sub>3</sub> pela PI3K, o qual se liga ao domínio PH da PKB (serina/treonina proteína quinase B) ou AKt, promovendo mudança conformacional na quinase. O segundo passo envolve a translocação da AKt do citosol para a membrana, onde a quinase é ativada por fosforilação (Andjelkovic et al., 1997). Uma vez ativada, a Akt promove uma série de eventos fisiológicos, como a estimulação da captação de glicose pelo músculo esquelético (PKB $\alpha$  é a isoforma mais expressa nos músculos) e pelos adipócitos (PKB  $\beta$  é a forma mais expressa nos adipócitos), via a translocação de transportadores de glicose (GLUT 4) para a membrana plasmática (Hahn-Windgassen et al., 2005).

Existem diferentes tipos de GLUT (pelo menos 7 tipos), o GLUT1 é expresso em altos níveis em eritrócitos humanos e em células endoteliais de vasos sanguíneos do cérebro. O GLUT3 é expresso primariamente nos neurônios e, juntos, GLUT1 e GLUT3 permitem a passagem da glicose pela barreira hematoencefálica do sistema nervoso central. O GLUT2 é um transportador de baixa afinidade presente no fígado, intestino e células beta pancreáticas. Entretanto, é o GLUT4 a isoforma mais responsiva à insulina e que se encontra restrita ao músculo esquelético e ao tecido adiposo (Watson & Pessin, 2001).

A importância do perfeito funcionamento deste sistema pode ser entendida quando avaliamos o efeito da inativação do gene para GLUT4 no tecido adiposo branco e na musculatura esquelética de camundongos. Nesta condição

os animais apresentam intolerância à glicose e hiperinsulinemia. Por outro lado, a superexpressão de GLUT4 no tecido adiposo branco aumenta a sensibilidade à insulina em todo o organismo e a tolerância à glicose em camundongos diabéticos (Watson & Pessin, 2001).



Esquema 1 - Sinalização da insulina

Outro importante hormônio no controle da homeostase energética é a leptina. Este hormônio modula a homeostase energética a longo prazo e a sua não funcionalidade ou a presença de defeitos em seus receptores, amplamente distribuídos pelo organismo, produzem obesidade em camundongos e em raros casos, em humanos (Friedman et al., 1994; Friedman et al., 1998; Guy-Grand et al., 1998).

A leptina é produzida pelo tecido adiposo branco (WAT) e regula a expressão de vários genes no hipotálamo. Estes incluem, SOCS-3, (*suppressor-*

*of-cytokine-signaling*) (Bjørbaek et al., 1998) c-fos (Elmqvist et al., 1997) e neuropeptídeos envolvidos na regulação do apetite e do peso do corpo (Elmqvist et al., 1999), incluindo NPY (Bugarith et al., 1995), AgRP (Ollmann et al., 1998), CART (Elias et al., 1998) e POMC (Cheung et al., 1997).

Na periferia, a leptina estimula a oxidação de ácidos graxos e captação de glicose pelo músculo e previne o acúmulo de lipídios em tecidos não adipogênicos, contribuindo para a prevenção da lipotoxicidade (Minokoshi et al., 2002). De acordo com Flier (2004) a deficiência deste hormônio está relacionada ao aumento de ingestão alimentar e supressão de gasto energético, podendo levar ao quadro de obesidade.

Assim como a insulina, a leptina é encontrada no sangue em concentração proporcional ao conteúdo de gordura do corpo. A ligação da leptina ao seu receptor ativa a proteína JAK2 (*Janus Kinase 2*), que por sua vez fosforila os resíduos de tirosina do receptor levando à ativação e recrutamento de moléculas sinalizadoras (Myers, 2004). Entre estas moléculas está o STAT 3 (sinal transdutor e ativador da transcrição 3), que se dimeriza e se transloca para o núcleo onde se liga a regiões específicas, induzindo a expressão gênica (Nakashima et al., 1997). Entretanto os níveis de secreção destes hormônios são influenciados pela recente ingestão alimentar e pelo conteúdo da dieta. Os níveis de insulina e leptina diminuem com o jejum e durante dietas de restrição calórica de maneira independente das mudanças de gordura no corpo, assegurando que a alimentação seja iniciada antes que o estoque de energia seja depletado (Havel, 2001).

A manutenção da homeostase energética e o controle da glicemia contam

com a importante participação do tecido muscular e adiposo. Em 1987, o tecido adiposo foi identificado como sendo o maior sítio do metabolismo de esteróides sexuais e secreção de diversos biofatores intimamente relacionados com a homeostase energética, tais como a leptina e a adiponectina (Kershaw & Flier, 2004). Embora o tecido adiposo capte aproximadamente apenas 10% da glicose total disponível ao organismo, a insulina tem um grande efeito nos adipócitos, promovendo a adipogênese, estimulando a captação de glicose, a síntese de lipídios e inibindo o processo de lipólise (Spiegelman et al., 2000).

A musculatura esquelética, por sua vez contribui para a homeostase da glicose através da intensa captação de glicose de maneira dependente de insulina e é o principal sítio de oxidação de glicose e ácido graxo e um importante reservatório de glicogênio. Do ponto de vista patológico o tecido muscular é o primeiro tecido responsável pela resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Kahn & Flier, 2000). Mas em estudos recentes, como o realizado por Prada et al. (2005) a resistência à insulina, induzida por uma dieta rica em gordura (Western diet), se instalou primeiro no hipotálamo, depois músculo e fígado.

### **CONTROLE CENTRAL DO METABOLISMO PERIFÉRICO**

Evidências recentes têm associado à presença de nutrientes e hormônios no liquor com alterações no comportamento alimentar e no metabolismo periférico. Neste sentido, em um recente estudo foi demonstrado que a atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), localizada no hipotálamo, é diminuída em resposta à insulina, leptina e glicose (Minokoshi et al., 2004). Esta proteína é reconhecida como sensor energético da célula e é capaz de sinalizar quando os

estoques de energia são satisfatórios ou quando o nível de energia na célula atinge níveis perigosos (Kahn et al., 2005; Hardie, 2004). Desta maneira, situações que diminuem os níveis de ATP intracelular ativam a AMPK promovendo alterações metabólicas que serão apresentadas posteriormente no texto.

### **A PROTEÍNA AMPK**

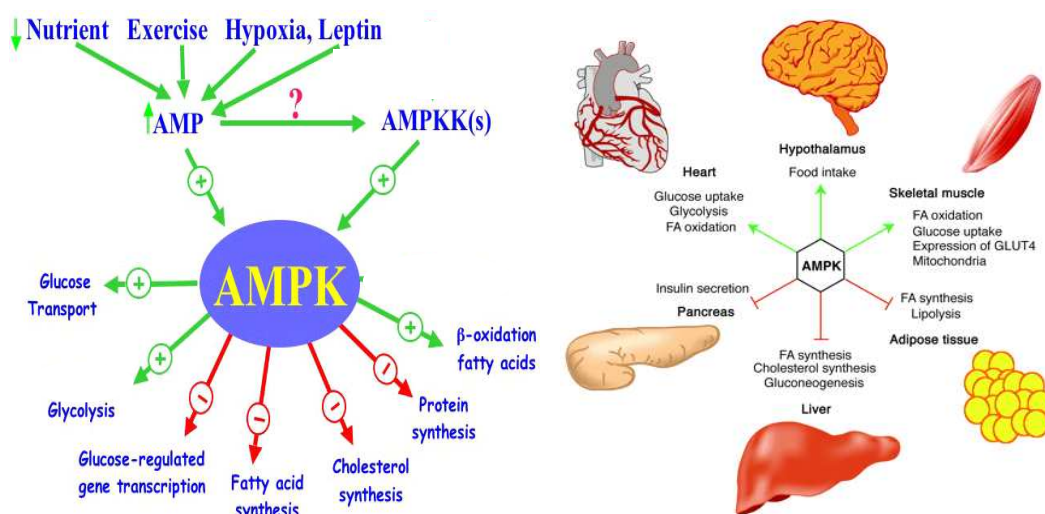
A proteína AMPK é encontrada em uma grande variedade de tecidos incluindo o fígado, pulmão, coração, musculatura esquelética, tecido adiposo e sistema nervoso central (Hutchinson & Bengtsson, 2005; Verhoeven et al., 1995) e sua estrutura protéica heterotrimérica é formada por uma subunidade catalítica ( $\alpha$ ) e duas subunidades regulatórias ( $\beta$  e  $\gamma$ ) (Kahn et al., 2005). Duas isoformas foram identificadas para as subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) e  $\beta$  ( $\beta_1$  e  $\beta_2$ ) e três isoformas foram reportadas para a subunidade  $\gamma$  ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  e  $\gamma_3$ ) (Salt et al., 1998). A subunidade  $\alpha$  contém um domínio quinase N terminal e um domínio C terminal ambos envolvidos na formação do complexo protéico. As subunidades  $\beta$  contem domínios C terminal conservados que são importantes na estrutura da AMPK, pois ajudam a formar um complexo com as subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  (Hudson et al., 2003). A subunidade  $\gamma$  contém 4 repetições de uma seqüência de 60 resíduos de aminoácidos chamada de domínio CBS que se dimerizam para se tornarem ativos. Os 2 dímeros formados recebem o nome de domínios Bateman (Rudolph et al., 2004) e possuem a capacidade de se ligar a uma molécula de AMP ou de ATP de maneira exclusiva, o que corrobora os achados de Boudeau et al. (2004) de que altas concentrações de ATP antagonizam a ativação da AMPK por AMP.

A ativação da AMPK é mediada alostericamente pela ligação do AMP e

pela fosforilação facilitada por esta ligação. A fosforilação da Thr172, por sua vez, é mediada por serina/treonina-quinases (LKB1 e CAMKK) e a desfosforilação é mediada pela fosfatase PP2C. O resultado da ativação da AMPK é a inibição de vias de consumo de energia (anabólicas), tais como gliconeogênese hepática, síntese de ácidos graxos, síntese de colesterol e síntese de proteínas e ativação de vias de produção de energia (catabólicas), tais como oxidação de ácidos graxos e glicólise (Diraison et al., 2004; Carling, 2004), como pode ser observado no esquema 2.

No hipotálamo a presença desta proteína tem sido associada a processos importantes para a homeostase energética tais como, a resistência hipotalâmica à insulina induzida pelo frio (Roman et al., 2005), modulação da fome (Kim et al., 2004), homeostase da glicose (Rutter et al., 2003) e proteção neuronal contra períodos de privação de nutrientes (Culmsee et al., 2001). Também têm sido associado a AMPK, a expressão de neuropeptídeos no hipotálamo e o sinal de saciedade induzido pela leptina e insulina no hipotálamo (Xue & Kahn, 2006).

Esquema 2 - Mecanismos modulados pela proteína AMPK e ações tecido específicas da AMPK sobre processos fisiológicos.



A sensibilidade hipotalâmica aos nutrientes tem sido amplamente discutida na literatura. No início dos anos 50, Mayer e outros autores, através de uma série de artigos (Mayer, 1953a, 1953b, 1955; Kennedy, 1953), discutiram e postularam a hipótese glucostática e a lipostática. Estas teorias atualmente não são excludentes, mas ganharam novos e importantes componentes. A hipótese lipostática passou a ser chamada de adipostática e com isso os depósitos de gordura e não os ácidos graxos circulantes passaram a ter o papel principal. Assim, de acordo com a hipótese adipostática, os hormônios insulina e leptina, e substratos tais como, ácidos graxos e glicerol circulantes são proporcionais aos depósitos de gordura e modulam as funções hipotalâmicas consistentes com as respostas neuroendócrina e comportamental.

### **AÇÃO DE NUTRIENTES NO HIPOTÁLAMO**

Os nutrientes circulantes muitas vezes refletem o estado nutricional do indivíduo. Assim, é razoável acreditar que estes, ao lado dos sinais hormonais, também desempenhem papel importante no controle central da homeostase energética. Para tanto, os nutrientes devem satisfazer alguns requisitos básicos para atuarem no sistema nervoso central: i) acessarem o hipotálamo através da barreira hemato-encefálica e ii) circularem em concentração proporcional ao estado nutricional.

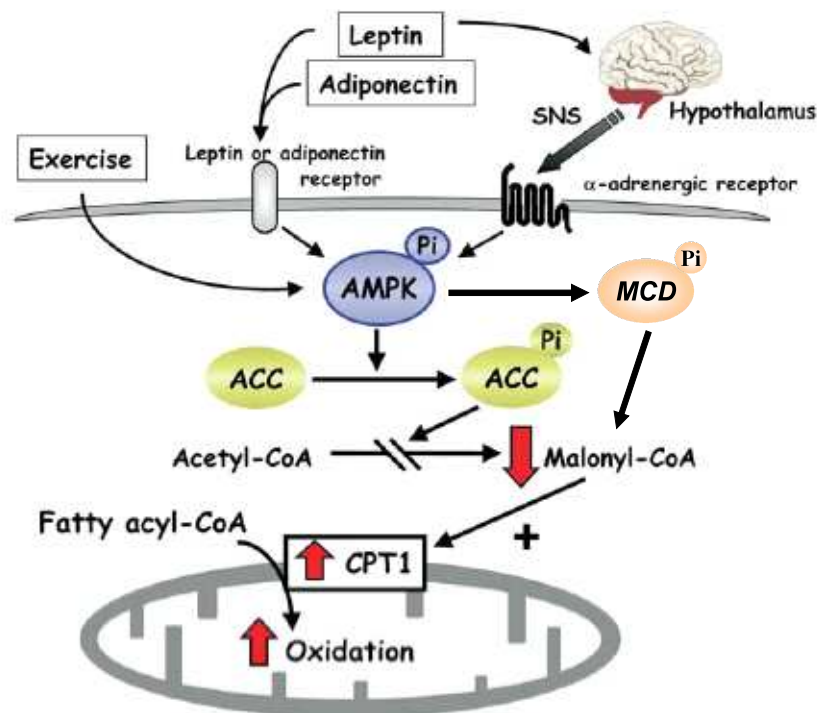
Interessantemente, os nutrientes podem desempenhar dois papéis importantes: primeiramente informar o sistema nervoso central a respeito das reservas energéticas corpóreas e ainda sinalizar a respeito do estado nutricional instantâneo do animal. Adicionalmente, os nutrientes ao lado dos intermediários

metabólicos, são excelentes sinais intracelulares do momento metabólico da célula. Neste sentido, o malonil-CoA, um importante intermediário do metabolismo de carboidratos e de ácidos graxos, tem sua síntese estimulada apenas em condições de disponibilidade de carboidratos para a síntese de ácidos graxos e, portanto, reflete um estado anabólico. O malonil-CoA é sintetizado a partir da carboxilação da acetil-CoA, catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), que é modulada negativamente pela atividade serina-quinase da AMPK. A partir da produção de malonil-CoA no citoplasma, a célula inicia a síntese de ácidos graxos e de maneira simultânea a oxidação é impedida através da inibição da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1) pelo próprio malonil-CoA (Esquema 3). Este importante mecanismo de regulação garante que, em condições de síntese de ácidos graxos, o processo de degradação estará inibido. Este mecanismo é observado em diferentes tipos celulares e o papel classicamente atribuído a ele é o de regular o metabolismo de ácidos graxos. A AMPK também fosforila a malonil-CoA descarboxilase (MCD), ativando-a. Essa condição promove uma queda no nível de malonil-CoA citosólico, o que resulta em importantes alterações no comportamento alimentar (Abu-Elheiga et al., 2001).

Assim no hipotálamo e em vários tecidos, a concentração de malonil-CoA funciona como um sensor para a disponibilidade de nutrientes e nível energético (Saha & Ruderman, 2000; Ruderman & Prentki, 2004), desde que a sua concentração no hipotálamo possa variar de acordo com o estado nutricional. Neste sentido, o estudo realizado por Hu et al. (2003), mostra que o nível de malonil-CoA no hipotálamo de camundongos é significativamente menor no jejum que no período pós-prandial.



Adicionalmente, a manipulação química do metabólito de malonil-CoA no hipotálamo também é responsável por alterações bioquímicas e endócrinas locais e periféricas, tais como: produção e captação de glicose pelo fígado, metabolismo de gordura e etc (Alquier et al., 2007).



Esquema 3 - Controle integrado da síntese malonil-CoA e inibição da carnitina palmitoil-transferase-1 (CPT1) pela proteína AMPK.

Entre os processos fisiológicos modulados pela AMPK, os mecanismos envolvidos com os sinais de saciedade, gasto energético e homeostase da glicose, têm recebido grande atenção da comunidade científica. Recentemente, Namkoong et al. (2005) demonstraram que o aumento na atividade da AMPK hipotalâmica contribuiu para a hiperfagia em ratos diabéticos e em camundongos com obesidade induzida por dieta (DIO) (Martin et al., 2006) a leptina não diminuiu

a ingestão de ração e não alterou a fosforilação da AMPK. Roman et al. (2005) demonstraram que a AMPK hipotalâmica tem importante participação da resistência central à insulina e do aumento da ingestão de ração induzido pela exposição do animal ao frio. Em outro importante estudo realizado por Han et al. (2005) foi demonstrado que a resposta contra-regulatória a hipoglicemia em ratos é dependente da AMPK hipotalâmica. Portanto, a modulação da via AMPK/ACC no hipotálamo está intimamente ligada a processos vitais da manutenção da homeostase corpórea.

A comunicação do hipotálamo com os tecido periférico é ainda mais evidenciada quando avaliamos a produção de glicose hepática em animais que foram tratados com insulina por via intracerebroventricular (ICV). Nestes animais a infusão de insulina no terceiro ventrículo suprimiu a produção de glicose pelo fígado de maneira independente dos níveis circulatórios de insulina e hormônios contra-regulatórios, mas dependente da ativação dos canais de potássio dependentes de ATP localizados no hipotálamo (Obici et al., 2002). Resultado similar foi obtido pelo mesmo grupo (Obici et al., 2003) quando administraram, via ICV, um inibidor farmacológico da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1) ou então bloquearam a expressão destas proteínas e observaram menor produção de glicose pelo fígado. Em outro modelo animal que apresenta insensibilidade a ácidos graxos no hipotálamo foi possível observar melhora significativa na sensibilidade após a inibição central da oxidação dos ácidos graxos. Este efeito foi particularmente observado sobre a ingestão de ração e produção de glicose pelo fígado (Pocai et al., 2006) Portanto, estes estudos sugerem fortemente a função fundamental do hipotálamo na homeostase energética e, ainda, nos mostra

que o metabolismo de ácidos graxos no hipotálamo está intimamente ligado a sensibilidade central a nutrientes e ao controle da homeostase energética. Então, a partir deste conhecimento e do papel desempenhado pela proteína AMPK no metabolismo de ácidos graxos no hipotálamo, no sinal de saciedade e na expressão de neuropeptídeos é possível inferir que intermediários metabólicos também podem participar do controle destes processos, desde que, sejam capazes de interferir na via AMPK/ACC.

Na bioquímica mitocondrial um mecanismo bioquímico muito bem descrito é o aumento dos níveis de citrato intra-mitocondriais decorrente da modulação negativa do ciclo do ácido cítrico. Esta condição promove o fluxo de citrato para o citoplasma fornecendo substrato para a síntese de ácidos graxos. A presença de citrato no citoplasma é fundamental para a ativação alostérica da ACC (Witters et al., 1991) e também por fornecer o acetil-CoA que será precursor do malonil-CoA, o substrato inicial da síntese de ácidos graxos. Portanto, o aumento da concentração de citrato poderia participar dos mesmos mecanismos ativados pela insulina, leptina e nutrientes no hipotálamo com reflexo sobre o metabolismo periférico. Assim, iremos avaliar o efeito do citrato no hipotálamo, no que se refere aos metabólitos e neuropeptídeos envolvidos na ingestão alimentar e seu efeito na homeostase periférica.

## **Materiais e Métodos**

### **1) Animais experimentais:**

Os experimentos foram realizados utilizando ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem Wistar entre oito e dez semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB), os quais foram alimentados com ração comercial para roedores (Nuvilab CR-1) da Nuvital e água oferecidos *ad libitum*. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco por gaiola) sob condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Os animais foram randomicamente divididos em grupos de acordo com o protocolo experimental a ser realizado. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP) segundo o protocolo nº 1277-1

### **2) Cirurgia Estereotáxica:**

Para a cirurgia de implantação da cânula no ventrículo lateral do hipotálamo, utilizamos ratos de 8 semanas de idade e peso corpóreo entre 250 – 300g. Os animais foram previamente anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de 0,7 ml de cloridrato de quetamina (50 mg/ml) e 0,3 ml de diazepam (5,0 mg/ml). O efeito anestésico foi avaliado através dos reflexos corneano e pedioso dos animais. Posteriormente os animais foram posicionados no aparelho de estereotaxia para implantação da cânula.

Para a inserção correta da cânula no ventrículo lateral, seguimos as coordenadas obtidas do Atlas Paxinos-Watson (Paxinos et al., 1980): antero-posterior (AP): 0,2 mm; lateral (L): 1,5 mm e dorso-ventral (DV): 4 mm. A fixação da cânula foi realizada através do implante de 2 parafusos (4 mm) e posterior cobertura com acrílico odontológico.

Após o período de uma semana de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos a um teste para avaliação da posição da cânula. Este teste é realizado através da avaliação do efeito dipsogênico obtido a partir da administração de angiotensina II (2,0 µl de solução  $10^{-6}$  M) na cânula. Os animais que apresentaram resposta positiva (ingestão hídrica de  $\geq 5$  ml/10 min) foram selecionados e utilizados nos experimentos posteriores.

### **3) Protocolo de tratamento com as drogas**

#### **3.1) Protocolo para o tratamento com citrato:**

Para os experimentos com citrato, os animais canulados foram tratados com injeção intracerebroventricular (ICV) de 0,002 ml de  $10^{-2}$  M de citrato (20 nmoles) em PBS (0,1 M fosfato + 0,9% de cloreto de sódio) 30 minutos antes do início da avaliação experimental.

A ingestão alimentar foi avaliada em um período de 12 h, após injeção de citrato por via ICV às 18:00h, o peso corpóreo, a quantificação do tecido adiposo e do nível de glicogênio muscular foram realizados em animais que receberam o citrato por via ICV às 18:00 h durante 7 dias. Neste protocolo experimental os animais foram mantidos durante 48 horas nas gaiolas individuais para adaptação.

### **3.2) Protocolo para o tratamento com adenina 9-β-D-arabinofuranosideo (ARA-A):**

Os animais canulados foram tratados com injeção intracerebroventricular (ICV) de 2 nmoles de ARA-A (adenina 9-β-D-arabinofuranosideo), um potente inibidor da AMPK, 30 minutos antes da extração dos tecidos ou aplicado às 18:00h para avaliação da ingestão alimentar durante o período noturno (12 horas).

### **3.3) Protocolo para o tratamento com insulina:**

O tratamento com insulina foi realizado através da administração de 0,2 mL de insulina ( $10^{-4}$ M) na veia cava (IV) (Gonzalez & McGraw, 2006). Este procedimento foi adotado quando o objetivo foi avaliar a fosforilação das proteínas da cascata de sinalização da insulina, IR, IRS1, IRS2 e AKt. A extração do tecido foi realizada de acordo com o tempo de ativação de cada proteína como descrito abaixo:

	<b>Adiposo</b>	<b>Músculo</b>
<b>IR e IRS1,2</b>	2-2,5 min	1,5 min
<b>AKt</b>	3-4,5 min	5-7 min

Para a análise da ativação das proteínas AKt e AMPK no tecido adiposo epididimal e no músculo *soleus* a extração ocorreu após injeção de insulina. Logo em seguida, quando necessário o hipotálamo foi retirado.

### **4) Dosagem de glicogênio muscular**

Os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas e

mantidos com ração e água *ad libitum* durante 48 horas para adaptação. Após este período iniciou-se o tratamento ICV com citrato (20 nmoles) ou salina às 18:00 h durante 7 dias. Após este período um fragmento do tecido muscular (50 mg) foi extraído para quantificação de glicogênio.

#### **4.1) Método de dosagem do glicogênio.**

Após a retirada do fragmento de músculo (50 mg) este foi imediatamente colocado em 1 mL de KOH 30% em banho-maria à 100°C por 1 hora, para que a digestão do tecido ocorresse. Após esse período, as soluções com os tecidos foram retiradas do banho e a elas foi adicionado 100 µl Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado (40%). Os tubos foram agitados e adicionados a eles, 2 ml de álcool etílico-PA. Novamente os tubos foram agitados por inversão e mantidos em banho-maria (100°C), para que o precipitado aparecesse. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 200-300 rpm e ressuspendido em 2 ml de água. Foi realizada uma curva padrão de glicose, para servir como padrão e a leitura das amostras foi realizada em 490 nm (Pimenta et al., 1989).

#### **4.2) Avaliação do efeito do citrato na ingestão alimentar de ratos em jejum:**

Após jejum de 10 horas os animais foram submetidos ao tratamento com 20 nmoles de citrato (tratamento ocorreu às 18:00 h) por via ICV e, após o fornecimento da ração, a ingestão nas 4 horas seguintes foi avaliada, no grupo que recebeu salina e no grupo tratado com citrato.

### **5) Medidas bioquímicas e hormonais:**

Para as medidas de glicose plasmática, amostras de sangue foram coletadas por lancetamento da cauda do animal, e a glicose foi medida pelo método da glicose oxidase (Trinder, 1969).

Para a determinação dos níveis séricos de insulina e corticosterona, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (IP) com uma mistura de 0,7 ml de cloridrato de quetamina (50 mg/ml) e 0,3 ml de diazepam (5,0 mg/ml) e as amostras de sangue foram coletadas por punção do plexo venoso retro-ocular com auxílio de capilares de vidro. Os níveis séricos de insulina e corticosterona foram medidos seguindo-se as especificações determinadas pelos Kits da Lynco Inc e DSL Inc, respectivamente.

Para a execução destes experimentos, os animais permaneceram em jejum de 10 horas.

### **6) Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT):**

O teste de tolerância à glicose foi realizado após jejum noturno de 10 horas. Os animais foram divididos em 2 grupos, controle e citrato. Após administração do anestésico o grupo controle recebeu salina via ICV e o grupo citrato recebeu 20 nmoles de citrato via ICV 30 minutos antes da administração da glicose em *bolus*. Depois de coletadas as amostras de sangue no tempo zero, uma solução de glicose 20% (2,0 g/kg de peso corpóreo) foi administrada intraperitonealmente. As amostras seguintes de sangue foram coletadas nos tempos 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose. Estas amostras foram utilizadas para as determinações de concentração de glicose e insulina plasmáticas.



### **7) Clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico:**

Para a realização deste procedimento experimental, os animais foram expostos a jejum de 05 horas e anestesiados (IP) com uma mistura de 0,7 ml de cloridrato de quetamina (50 mg/ml) e 0,3 ml de diazepam (5,0 mg/ml). Após a perda dos reflexos corneano e pedioso, os cateteres foram implantados na veia jugular esquerda (para infusão) e na artéria carótida (para coleta das amostras de sangue), como previamente descrito por Prada et al. (2000). A ingestão alimentar e o ganho de peso foram monitorados após o procedimento cirúrgico até a completa recuperação dos animais.

Após o período de recuperação, os animais foram mantidos em jejum de 10 horas, e o clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico de 120 minutos foi realizado como descrito por Combs et al. (2001) e Rossetti et al. (1997). Os animais receberam continuamente uma infusão de 3,0 mU/kg/min de insulina humana para que a concentração plasmática de insulina atingisse aproximadamente 800-900 pmol/litro.

As amostras de sangue (20 µl) foram coletadas em intervalos de 5 minutos para a quantificação da concentração de glicose plasmática que foi medida usando um glicosímetro (Advantage, Roche Molecular Biochemicals). Para a manutenção da concentração de glicose plasmática nos níveis observados em jejum, uma solução de glicose 10% foi infundida nos animais em taxas variáveis. O fluxo de glicose estimulado por insulina foi estimado usando-se uma infusão contínua de [<sup>3</sup>H] glicose purificada em HPLC (bolus de 10 µCi, 0,1 µCi/min),

segundo o procedimento de clamp descrito por Yang et al. (2001). Para se estimar a atividade do transporte de glicose estimulada por insulina e avaliar metabolismo de glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo visceral, foi administrado um *bolus* de 10  $\mu\text{Ci}$  de 2-[ $^{14}\text{C}$ ] DG1, 45 minutos antes do final do procedimento do clamp. Amostras de sangue (20 $\mu\text{l}$ ) foram coletadas nos tempos 80, 90, 100, 110 e 120 minutos após o início do procedimento do clamp para se determinar as concentrações de [ $^3\text{H}$ ] glicose e 2-[ $^{14}\text{C}$ ] DG1. Todas as infusões foram feitas usando-se bombas de infusão Harvard.

No final do clamp, os animais foram sacrificados com injeção (iv) de tiopental sódico. Num prazo de 02 minutos, os músculos esqueléticos (*soleus* e gastrocnêmio) das duas patas traseiras e o tecido adiposo epididimal foram extraídos. Cada tecido foi pesado, congelado em  $\text{N}_2$  líquido e estocado em *biofreezer*  $-70^\circ\text{C}$ , para análise posterior da captação de glicose.

Em experimento independente, as taxas do *turnover* basal de glicose foram medidas por infusão contínua de [ $3\text{-}^3\text{H}$ ] glicose (0,02  $\mu\text{Ci}/\text{min}$ ) por 120 minutos, e as amostras de sangue (20  $\mu\text{l}$ ) foram coletadas em 100, 110 e 120 minutos após o início do experimento para determinação da concentração plasmática de [ $^3\text{H}$ ] glicose.

Procedimento analítico do clamp: a concentração de glicose foi medida usando um glicosímetro (Advantage, Roche Molecular Biochemicals). As amostras de plasmas foram deproteínizadas com volumes iguais de hidróxido de bário e sulfato de zinco (0.03 N) e estocados overnight à  $4^\circ\text{C}$ . A radioatividade da [ $3\text{-}^3\text{H}$ ] glicose no plasma foi medida (desintegração por minuto por mg de glicose),

utilizando o sobrenadante do precipitado de  $\text{Ba}(\text{OH})_2/\text{ZnSO}_4$ , depois que cada tubo foi evaporado para remover a água tritiada.

### **7.1) Análise da captação de 2-[ $^3\text{H}$ ]-deoxiglicose (2DG) pelo músculo esquelético e pelo tecido adiposo epididimal:**

Os tecidos obtidos dos animais que foram submetidos ao *clamp* foram colocados em uma solução solubilizadora de tecidos NCS-II (200mg de tecido para 1 ml de solução) e centrifugados em 16000g à 25 °C por 2 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 3 ml de líquido cintilador e a radioatividade do  $^3\text{H}$  foi determinada por contagem em líquido de cintilação.

### **8) Fracionamento subcelular:**

Após anestesia, a cavidade abdominal dos animais foi aberta e a insulina regular (0,2 ml,  $10^{-6}$  M ou 1,5 U) foi administrada na veia cava. Os tecidos periféricos (músculo esquelético *soleus* e tecido adiposo epididmal) foram retirados e imediatamente homogeneizados com processador do tipo *polytron* em tubos *falcon* contendo solução tampão de extração (0,32 M sacarose, 20 mM tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100mM NaF, 100 mM pirosofato de sódio, 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (ortovanadato de sódio), 1mM PMSF e 0,1mg/ml aprotinina) e mantido todo o tempo em gelo. A seguir, as amostras foram submetidas à centrifugação (1.000 X g, 25minutos, 4°C) para se obter a separação das frações.

O sobrenadante resultante da centrifugação foi retirado e ultracentrifugado

(100.000 X g, 60 minutos, 4°C) para se obter o sobrenadante que corresponde a fração citosólica, o qual foi retirado e armazenado em gelo. O pellet obtido desta última centrifugação foi ressuspenso em solução tampão para fracionamento subcelular (tampão de extração mais 1% de Nonidet P-40) mantido em gelo por 20 minutos e ultra centrifugado (100.000 X g, 10 minutos, 4°C), obtendo-se assim, o sobrenadante que corresponde a fração de membrana. Parte do sobrenadante da fração citosólica e de membrana foram submetidos à determinação do conteúdo de proteínas totais pelo método espectrofotométrico de Biureto (Bradford, 1976), enquanto que a outra parte foi submetida ao *immunoblotting*.

#### **9) Extração de tecidos para imunoprecipitação e *immunoblotting***

Para a extração dos tecidos, os animais foram anestesiados e após os diferentes tratamentos, a cavidade abdominal do animal foi aberta e um fragmento de tecido foi retirado e homogeneizado em 2 mL de tampão de solubilização (1% Triton X-100; 100 mM Tris pH 7,4; contendo 100 mM de pirofosfato de sódio; 100 mM de fluoreto de sódio; 10 mM de vanadato de sódio; 2 mM PMSF e 0,1 mg de aprotinina/mL) a 4°C em “Politron PTA 20S generator” (Brinkmann Instruments mode PT 10/35) com velocidade máxima por 30 segundos. Em seguida, o crânio foi aberto, o hipotálamo retirado e homogeneizado em aproximadamente 1 mL do mesmo tampão de solubilização utilizado para o adiposo e músculo a 4°C em “Politron PTA 20S generator” (Brinkmann Instruments mode PT 10/35) com velocidade máxima por 30 segundos.

Os homogeneizados foram então centrifugados a 11.000 rpm por 30 minutos para remoção de material insolúvel. Nos sobrenadantes foram

determinadas as concentrações de proteínas utilizando-se o método de Biureto. Os sobrenadantes contendo as concentrações de proteínas conhecidas foram ressuspensos em tampão de Laemmli (100  $\mu$ L de tampão/400  $\mu$ L de amostra) contendo 100 mmol de DTT e armazenados em biofreezer -80°C até a utilização do material (extrato total) para o imunoblotting. Em alguns casos, o sobrenadante foi utilizado para a técnica de imunoprecipitação.

### **9.1) Imunoprecipitação:**

Para o método de imunoprecipitação, as amostras solubilizadas foram centrifugadas a 11000 rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado para imunoprecipitação. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica (1,0 mg de proteína total por amostra). As amostras foram incubadas por 12 a 14 horas a 4°C, com o anticorpo de interesse. Para recuperação dos imunocomplexos a mistura foi incubada com Proteína A Sepharose 6MB por 2 horas a 4°C. Após este período a proteína A Sepharose foi decantada por centrifugação por 15 minutos a 4°C/11.000 rpm. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (2,0 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado restando apenas as proteínas precipitadas (imunocomplexos) (Velloso et al., 1996). Os imunocomplexos foram ressuspensos em 25  $\mu$ l de tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/l de DTT.

## **9.2) Imunoblotting:**

Para a técnica de *imunoblotting*, as amostras de imunoprecipitado e do extrato total, foram fervidas rapidamente (5 minutos). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD durante 120 min a 80 Volts, em gelo, e banhadas com tampão de transferência. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 12 a 14 horas com anticorpo específico. A ligação do anticorpo às proteínas não específicas foi minimizada pela pré-incubação das membranas de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/l de Tris, 150 mmol/l de NaCl, 0,02% de Tween 20) por 1,5 hora. A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida por meio de tratamento com <sup>125</sup>I-proteína A em 10 ml de tampão de bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente e exposição a filmes de RX Kodak a 80°C por 36 - 72 horas. Após a revelação das auto-radiografias as bandas obtidas foram quantificadas por meio de densitometria óptica (Araujo et al., 2005; Velloso et al., 1996).

## **10) Análise por RT-PCR**

### **10.1) Extração de RNA do Hipotálamo:**

Após os tratamentos com citrato, as extrações do hipotálamo foram realizadas segundo o método de extração de tecidos. O material foi homogeneizado em polítron em um volume de 1 mL de Trizol. Após a

homogeneização, o material insolúvel foi removido por centrifugação a 12.000g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante, contendo o RNA, foi então transferido para outro tubo e mantido em repouso por 5 minutos, o que permitiu a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida, foi adicionado 0.2 mL de clorofórmio/1mL de Trizol e a amostra foi agitada vigorosamente por 15 segundos e incubada em temperatura ambiente por 3 minutos. Após centrifugação a 12.000g, por 15 minutos, a 4°C, a amostra ficou separada em duas fases: a inferior, de coloração rosada, denominada orgânica e a superior, mais clara, denominada aquosa, que abrange cerca de dois terços do volume total. Nestas fases estão solubilizados o DNA e o RNA, respectivamente, além da banda de proteínas presente entre as duas. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo, onde o RNA foi precipitado através de incubação por 10 minutos, à temperatura ambiente, com 0.5 mL de isopropanol, seguida de centrifugação a 12.000g, por 10 minutos, a 4°C. Para lavar o RNA, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de etanol 75% e a amostra centrifugada a 7.500g, por 5 minutos, a 4°C. O RNA foi eluído em 50 µl de água RNase-free e quantificado em espectrofotômetro a 260nm. A integridade do RNA obtido foi determinada submetendo as amostras à eletroforese em gel de agarose (1,5%). O RNA obtido foi tratado com DNase a fim de eliminar qualquer contaminação com DNA genômico.

### **10.2) Reação de transcrição reversa:**

A fita-molde de cDNA foi obtida através de uma reação de transcrição reversa. Para tanto, as amostras de RNA foram submetidas a uma seleção do

RNAm, utilizando-se um *primer poli dT*, e posteriormente à transcrição com a enzima transcriptase *Superscript III*. Após a transcrição em cDNA, a amostra foi tratada com RNase A para eliminação de resíduos de RNA. O DNA obtido de animais controle e tratados com citrato foi amplificado por PCR utilizando primers específicos para os genes de interesse (NPY, POMC, AgRP, CRH, PEPCK, G6Pase) e RPS29 (utilizado como controle da reação de PCR).

### **10.3) Reações de amplificação:**

Para as reações de PCR foram sintetizados oligonucleotídeos para as seqüências dos genes do Neuropeptídeo Y (NPY), POMC, CRH e do RPS29 (proteína S29 da subunidade ribossomal 40S de *Drosophila melanogaster*), mostrados na tabela 1.

A reação consistiu em desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento com temperatura específica para cada oligo, extensão a 72°C por dois minutos e um ciclo adicional a 72°C por cinco minutos para corrigir eventuais falhas na seqüência. Foram utilizados 31 ciclos e TM de 62°C para os neuropeptídeos NPY e CRH. Para POMC e AgRP foram utilizados TM de 63°C e 32 ciclos e 61 °C e 31ciclos, respectivamente. A TM utilizada para RPS29 foi de 57°C e 27 ciclos.

O fragmento gerado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,0% com brometo de etídeo e visualizado por luz ultra-violeta.

Tabela 1: Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR.



Oligonucleotídeo	Sequência
NPY sense	5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCT -3'
NPY anti-sense	5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGA -3'
CRH sense	5'-ATCCGCATGGGTGAAGAATA-3'
CRH anti-sense	5'-AAGCGCAACATTTTCATTTCC-3'
POMC sense	5'-CTCCTGCTTCAGACCTCCAT-3'
POMC anti-sense	5'- TTGGGGTACACCTTCACAGG-3'
RPS29 sense	5'-GGAAGAGTGAGCGGCCATCAAGG-3'
RPS29 anti-sense	5'-TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC-3'

NPY - Neuropeptídeo Y; CRH - Hormônio Liberador de Corticotrofina; POMC - Propiomelanocortina;; RPS29 - proteína S29 da subunidade ribossomal 40S de *Drosophila melanogaster*.

## 11) Análises Estatísticas

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  SD do número indicado de experimentos. Os resultados dos blots estão apresentados em comparação direta das bandas em autoradiografia e quantificados por densitometria com base no software Scion Image (ScionCorp) e expressos em unidades arbitrárias. As comparações foram feitas entre as médias das intensidades das bandas encontradas nos resultados dos animais controles e tratados. O teste usado para as análises estatísticas foi o teste Student's *t* e para a análise de variância utilizamos o teste Tukey. O nível de significância usado foi  $P < 0,05$ .

## **Resultados**

### **1) Efeito do citrato e do ARA-A na ingestão alimentar, na fosforilação da AMPK e da ACC hipotalâmicas de animais com livre acesso a ração:**

#### **1.1) Ingestão alimentar**

Para avaliar se o tratamento com citrato poderia induzir sinal de saciedade, a ingestão de ração foi avaliada em um período de 12 horas (18:00-06:00) após administração de citrato (Figura 1A). Nesta figura podemos observar que os animais que receberam salina ICV ingeriram  $20 \pm 1,3$  gramas de ração, enquanto que os animais que receberam citrato ICV ingeriram  $13 \pm 0,7$  gramas de ração no mesmo período. A administração por via ICV de ARA-A (2 nmoles), um inibidor competitivo da AMPK, do mesmo modo que o citrato, diminuiu a ingestão alimentar ( $15 \pm 1,1$  gramas de ração após ICV de ARA).

#### **1.2) Fosforilação da AMPK e da ACC Hipotalâmicas**

A figura 1B mostra o efeito do citrato e do ARA-A na fosforilação da AMPK hipotalâmica. O nível de fosforilação da AMPK no grupo tratado com citrato foi aproximadamente 60% menor que no grupo controle ( $46,48 \pm 12,8$  e  $116,2 \pm 13,4$ , respectivamente). O mesmo foi observado para a fosforilação da ACC, que foi 70% menor no grupo citrato em relação ao grupo controle ( $32,4 \pm 7,8$  e  $110,3 \pm 13,9$ , respectivamente).

### **2) Efeito do citrato na ingestão alimentar e na ativação da AMPK hipotalâmica de animais mantidos em jejum prévio:**

### **2.1) Avaliação da ingestão alimentar**

Foi avaliado o efeito do citrato sobre a ingestão de ração em animais que estavam previamente jejum (Figura 2A). Este efeito foi avaliado nas próximas 4 horas após a oferta da ração. Os animais que receberam citrato ingeriram  $2,7 \pm 0,45$ g e os animais que receberam salina ingeriram  $6,5 \pm 0,35$  no mesmo período.

### **2.2) Avaliação da fosforilação da AMPK hipotalâmica**

Na figura 2B podemos observar o nível de fosforilação e conseqüente ativação da AMPK no hipotálamo de ratos controle e tratados com citrato. O citrato provocou significativa redução (70%) no nível de fosforilação da AMPK hipotalâmica se comparado com o controle.

### **3) Efeito do tratamento com citrato na ingestão alimentar, no ganho de peso e na massa de tecido adiposo epididimal e perirenal:**

O tratamento com citrato durante o período de 7 dias resultou em significativa redução na ingestão diária de ração (aproximadamente 25% em relação ao controle) (Figura 3 A). Este efeito foi acompanhado pela redução do peso corpóreo final do animais que receberam citrato por 7 dias. De acordo com a figura 3B, os animais controle ganharam aproximadamente  $35 \pm 2,5$  gramas no período de 07 dias, enquanto que os animais tratados com citrato perderam cerca de  $5 \pm 1,25$  g no mesmo período. A massa de tecido adiposo epididimal e tecido adiposo perirenal reduziram 33% e 26% em relação ao grupo controle, respectivamente. No grupo *pair fed*, a redução da massa dos tecidos adiposos epididimais e

perirenais em relação ao grupo controle foram menores, 17% e 24%, respectivamente (Figuras 3 C e 3 D).

#### **4) Efeito do citrato na expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos:**

As figuras 4A e 4B mostram que o citrato aumentou a expressão gênica para os neuropeptídeos anorexigênicos CRH em torno de 10 vezes e do POMC em torno de 1,8 vezes se comparado com a expressão destes genes encontrada nos animais do grupo controle. Por outro lado, a expressão do gene do neuropeptídeo orexigênico NPY foi diminuída (em aproximadamente 1,6 vezes) pelo tratamento com citrato (Figura 4C). A figura 4 D apresenta os RNAs (m) dos neuropeptídeos e da proteína constitutiva RPS29.

#### **5)- Efeito do citrato (ICV) na concentração de insulina no sangue e nos níveis de corticosterona no plasma.**

Como pode ser observado na tabela I, o nível de insulina não variou significativamente durante o período analisado. No intervalo de 60 minutos, o nível máximo de insulina sérica foi de  $9,3 \pm 1,3$  pmol/l para o tempo de 10 minutos após a administração de citrato. Após 30 e 60 minutos os valores foram de  $8,7 \pm 2,5$  pmol/l e  $8,8 \pm 1,9$  pmol/l, respectivamente. Para todos os tempos determinados as diferenças observadas para o nível basal ( $8,5 \pm 2,0$  pmol/l) não foram significativas. A aplicação de citrato (ICV) diminuiu os níveis de corticosterona no plasma dos animais em aproximadamente 42% em relação aos animais controle (salina, ICV).

## **6) Efeito do citrato na captação de glicose:**

### **6.1) Teste de Tolerância à Glicose (GTT)**

O tratamento com citrato (ICV) induziu maior captação de glicose, como demonstrado pelo teste de tolerância à glicose intraperitoneal (GTT) (Figura 5A). Os animais que receberam citrato apresentaram a área sob a curva glicêmica significativamente menor (50%) que os animais do grupo controle. Para avaliar se este efeito decorreu de um aumento da secreção de insulina pelo pâncreas, a insulinemia foi avaliada durante o GTT. Como pode ser observado na figura 5B o nível de insulina sérica, durante o teste de tolerância a glicose, foi sempre menor no grupo citrato que nos animais do grupo controle.

## **7) Clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico:**

### **7.1) Efeito do citrato na captação de glicose pelo organismo e na taxa de infusão de glicose**

Como podemos observar através da figura 6A, os animais mantidos em jejum e que receberam citrato por via ICV 30 minutos antes do início do teste apresentaram captação de glicose cerca de 1,3 vezes maior que o grupo controle (controle:  $29,2 \pm 2,2$  mg/kg/min e tratado com citrato:  $39,5 \pm 3,1$  mg/kg/min). Da mesma maneira a taxa de infusão de glicose foi cerca de 1,5 vezes maior no grupo citrato que no grupo controle (Figura 6B).

### **7.2)- Efeito do citrato na captação de 2 [<sup>3</sup>H]-deoxiglicose pelo tecido**

## **adiposo epididimal e pelo músculo esquelético**

Como descrito na figura 6C o tecido adiposo epididimal do grupo citrato ( $22,0 \pm 1,0$   $\eta\text{mol/g/min}$ ) captou mais  $2[{}^3\text{H}]$ -deoxiglicose que o observado no grupo controle ( $16,0 \pm 1,2$   $\eta\text{mol/g/min}$ ). No tecido muscular, na presença de citrato a captação foi de 1,6 vezes maior que em sua ausência ( $40,2 \pm 2,3$  versus  $25,0 \pm 15$   $\eta\text{mol/g/min}$ , respectivamente) (Figura 6D).

### **8) Expressão de GLUT4:**

#### **8.1) No tecido adiposo epididimal**

O tratamento com citrato ICV aumentou a presença de GLUT4 no tecido adiposo em todas as frações avaliadas. No extrato total a presença do citrato aumentou (4,2 vezes) a expressão do GLUT4 (Figura 7A). Da mesma maneira, o citrato também aumentou a concentração de GLUT4 na fração citosólica (1,2 vezes) (Figura 7B) e na fração de membrana (4,2 vezes) (Figura 7C).

#### **8.2) No músculo esquelético**

A expressão de GLUT4 no músculo se comportou da mesma forma que no tecido adiposo epididimal. No extrato total o grupo citrato apresentou 4,4 vezes mais GLUT4 quando comparado ao grupo controle (Figura 8A). Na fração citosólica das células musculares do grupo citrato a presença de GLUT4 foi 3,5 vezes maior que no grupo controle (Figura 8B) e na fração de membrana este aumento foi da ordem de 8,6 vezes maior em relação com grupo controle (Figura 8C).

### **9) Dosagem do nível de glicogênio muscular:**

Após o tratamento de 7 dias com citrato ICV, o tecido muscular (*soleus* e gastrocnêmico) foi retirado para dosagem de glicogênio. Como mostrado na figura 9 o tratamento com citrato potencializou a produção de glicogênio muscular ( $0,34 \pm 0,03$  mg/dg) em relação ao grupo controle ( $0,22 \pm 0,05$  mg/dg).

### **10) Efeito do citrato na ativação da AMPK e ACC.**

#### **10.1) Fosforilação da AMPK e ACC no tecido adiposo epididimal**

As figuras 10A e 10B mostram a fosforilação da AMPK e da ACC no tecido adiposo branco epididimal, respectivamente. Para este experimento, os animais permaneceram em jejum e foi possível observar que a administração de insulina (IV) aumentou o nível de p-AMPK em cerca de 29% ( $118,5 \pm 8,56$ ) se comparado aos animais controle ( $84,28 \pm 6,25$ ). Os animais que receberam citrato ICV apresentaram um nível de fosforilação da AMPK ( $64,6 \pm 5,21$ ) um pouco menor quando comparado ao grupo controle, enquanto o tratamento com citrato ICV e insulina na cava apresentou uma diminuição ainda maior na fosforilação da AMPK ( $41,4 \pm 2,14$ ) se comparado com o grupo citrato. Para avaliar se a alteração do nível de p-AMPK refletiu em queda na atividade quinase da enzima, a fosforilação da ACC foi determinada. Pois, como descrito na literatura, a enzima ACC é um dos principais alvos da AMPK na célula. Assim, a diminuição da sua fosforilação indica indiretamente menor atividade da AMPK. Como pode ser observado na figura 10B, a fosforilação da ACC nos animais que receberam citrato (ICV) e

insulina (IP) foi menor que no grupo que recebeu somente insulina e menor que do grupo citrato.

## **10.2) Fosforilação da AMPK e ACC no músculo estriado esquelético (*soleus*)**

Como pode ser observado nas figuras 11A e 11 B o tratamento com insulina na cava promoveu a redução na fosforilação da AMPK (aproximadamente de 34% em relação ao controle). O mesmo foi observado com a aplicação de citrato ICV, uma queda de 58% ( $46,2 \pm 5,32$ ) na fosforilação da AMPK em relação ao controle ( $111,7 \pm 6,25$ ). Quando a insulina foi administrada aos animais previamente tratados com citrato, a redução na fosforilação da AMPK foi de 27% se comparado ao grupo citrato. Na figura 11B podemos observar que o efeito da insulina e do citrato na fosforilação da ACC foi similar ao observado para a AMPK.

## **11) Avaliação da transdução do sinal da insulina após tratamento com citrato:**

### **11.1) Transdução do sinal da insulina no tecido adiposo epididimal**

O efeito do citrato na sinalização da insulina foi observado monitorando as alterações nos níveis de fosforilação e expressão das moléculas envolvidas na cascata de sinalização da insulina (IR, IRS1, IRS2, Akt). O nível de fosforilação foi avaliado na ausência ou presença da insulina administrada através da cava (0,2 ml de insulina  $10^{-4}$ M) de animais que receberam salina, citrato (20 nmoles) ou ARA-A (2 nmoles) ambos via ICV. Os animais permaneceram em jejum prévio de 10 horas e foram divididos em 6 grupos: grupo controle (C), grupo controle que recebeu injeção de insulina na cava (C+), grupo de animais que receberam citrato



ICV (CIT), e grupo que recebeu citrato ICV e posterior injeção de insulina na cava (CIT+), grupo de animais que recebeu ARA-A ICV (ARA-) e grupo de animais que recebeu ARA-A e posterior injeção de insulina na cava (ARA+).

A figura 12A mostra o efeito do citrato (ICV) no nível de fosforilação do receptor da insulina (IR). De acordo com esta figura, podemos observar que a administração de insulina na cava induziu a fosforilação do IR (aproximadamente na ordem de 3 vezes). A administração de insulina nos animais previamente tratados com citrato via ICV potencializou o efeito da insulina (2,3 vezes) quando comparado ao grupo insulina.

Para avaliarmos a importância da inibição hipotalâmica da AMPK na ativação do IR, foi administrado por via ICV 2 nmoles de 9- $\beta$ -D-arabinofuranosideo (ARA-A), um inibidor competitivo da AMPK. Neste caso, foi observado que após injeção de insulina, a fosforilação do IR no grupo ARA-A+ foi 3 vezes maior que no grupo controle (C+) (Figura 12A).

A proteína IRS1 apresentou nível de fosforilação similar ao encontrado para o receptor de insulina. Como pode ser observado na figura 12B a administração de insulina em animais previamente tratados com citrato foi cerca de 2,1 vezes maior que a determinada no grupo que recebeu apenas a insulina na cava. Resultados similares foram encontrados com a administração de ARA-A na ausência e presença de insulina.

Na figura 12C podemos observar que a fosforilação do IRS2 (substrato 2 para o receptor de insulina) obedeceu o mesmo comportamento encontrado quando a proteína IRS1 foi avaliada.

A figura 12D nos mostra que os animais que receberam somente citrato

apresentaram um aumento da fosforilação da AKt ( $62 \pm 8,9$ ) quando comparado ao grupo C- ( $19,5 \pm 5,2$ ). Quando a insulina foi administrada em animais previamente tratados com citrato via ICV o nível de fosforilação da AKt foi significativamente maior que o observado no grupo que recebeu apenas salina via ICV (CIT+:  $142 \pm 25,7$ ; C+:  $43,2 \pm 9,3$ )

O tratamento com ARA-A induziu aumento na fosforilação da AKt no grupo ARA-A em relação ao grupo C-. Os animais que receberam insulina após tratamento com ARA-A apresentaram um aumento na fosforilação da AKt de cerca de 2,5% se comparado ao grupo C+ (figura 12D). Nenhum dos tratamentos alterou a expressão das proteínas da cascata de sinalização da insulina.

### **11.2) Transdução do sinal da insulina no músculo estriado esquelético**

O efeito do citrato na sinalização da insulina no músculo (*soleus*) foi avaliado da mesma forma que no tecido adiposo epididimal. Na Figura 13 podemos observar que o tratamento com insulina (IP) induziu maior fosforilação em todas as proteínas analisadas da cascata de sinalização da insulina, se comparadas ao controle negativo para o hormônio. O tratamento prévio com citrato ICV potencializou o efeito da insulina na fosforilação do IR (1,5 vezes), do IRS2 (1,7 vezes) e da AKt (1,4 vezes) (Figura 12 A, C e D). Em relação ao tratamento com ARA-A, de maneira similar ao citrato, o prévio tratamento com este inibidor da AMPK não potencializou o efeito da insulina na fosforilação das proteínas IRS1 e IR. Contudo, para as proteínas IRS2 (ARA-A+:  $301,5 \pm 43,8$ ; C+:  $152 \pm 26,3$ ) e AKt (ARA-A+:  $223,1 \pm 62,5$ ; C+:  $138,9 \pm 12,4$ ) a prévia administração de ARA-A potencializou o efeito da insulina. Nenhum dos tratamentos alterou a expressão das proteínas envolvidas na cascata de sinalização desse hormônio.

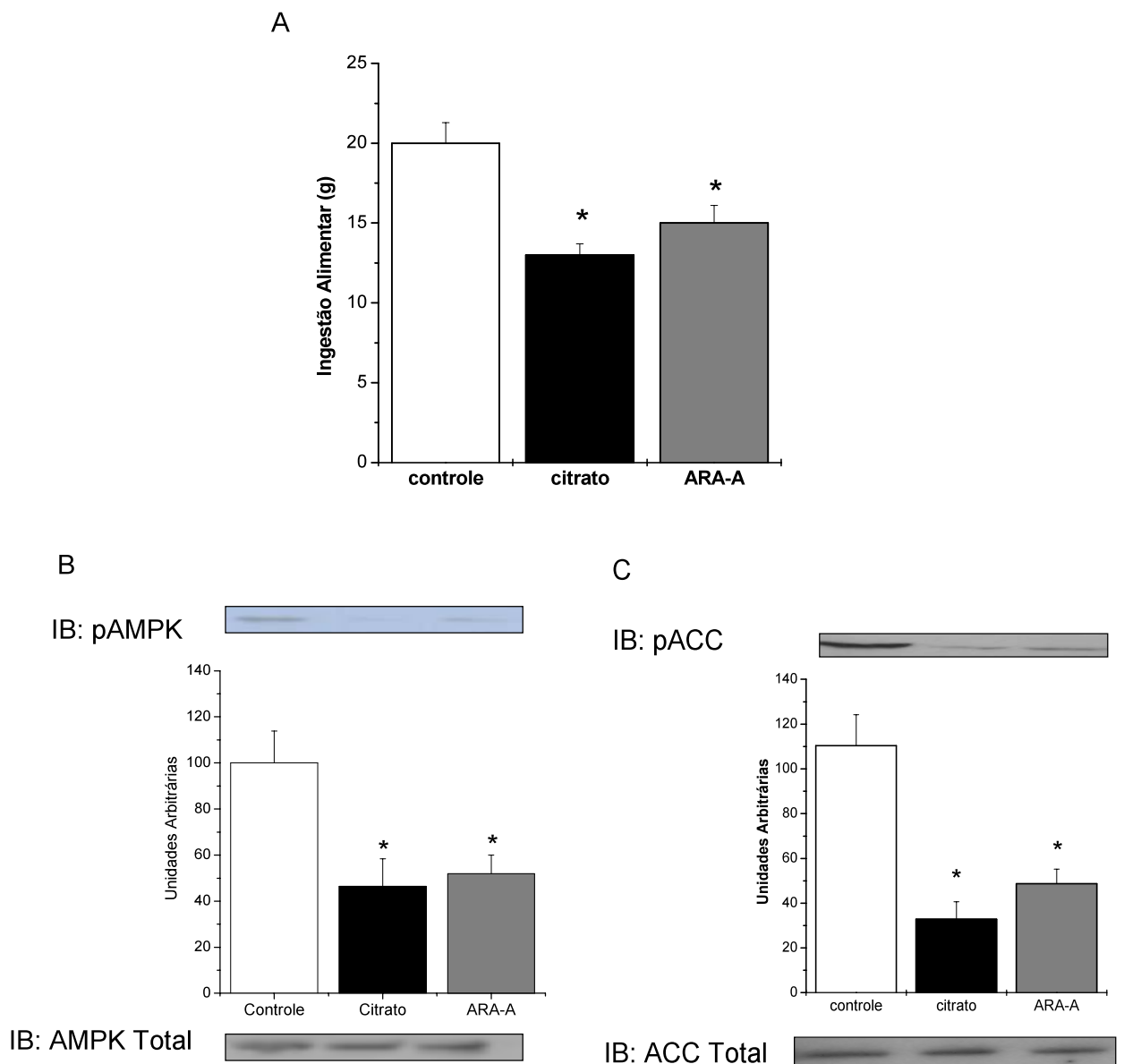


Figura 01- Efeito do citrato na ingestão alimentar de 12 h (A) e na fosforilação da AMPK (B) e da ACC (C) hipotalâmicas de ratos alimentados *ad libitum*. Os resultados foram determinados após injeção de 20 nmoles de citrato (ICV) ou de 2 nmoles de ARA-A (ICV). Os lisados (B e C) foram preparados como descrito em Materiais e Métodos, submetidos à SDS-PAGE e realizado imunoblot contra o anticorpo p AMPK e p-ACC. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 3 experimentos independentes de um total de 10 ratos/tratamento em A e 5 ratos/tratamento em B e C. Os blots foram quantificados por densitometria óptica pelo Software Scion Corp. \*  $P \leq 0,05$  para os grupos citrato versus controle (ICV de salina) e ARA-A versus controle .

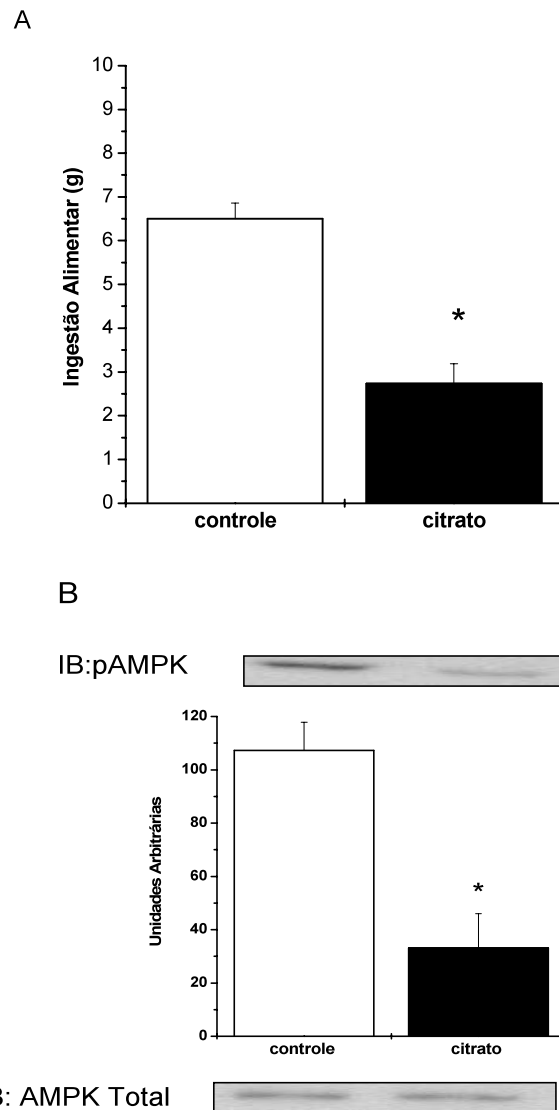


Figura 02 - Efeito do citrato na ingestão alimentar (A) e na fosforilação da AMPK hipotalâmica (B) de ratos mantidos em jejum de 10 horas. Os resultados foram determinados após injeção de 20 nmoles de citrato (ICV) e a ingestão alimentar foi medida após 04 horas de ICV de citrato. O nível de fosforilação da AMPK foi quantificado com anticorpo p-AMPK e o resultado foi normalizado utilizando-se a quantidade total da proteína AMPK. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 3 experimentos independentes de um total de 10 ratos/tratamento em A e 5 ratos/tratamento. Os blots foram quantificados por densitometria óptica pelo Software Scion Corp. \*  $P \leq 0,05$  para os grupos citrato versus controle (ICV de salina) e ARA-A versus controle.

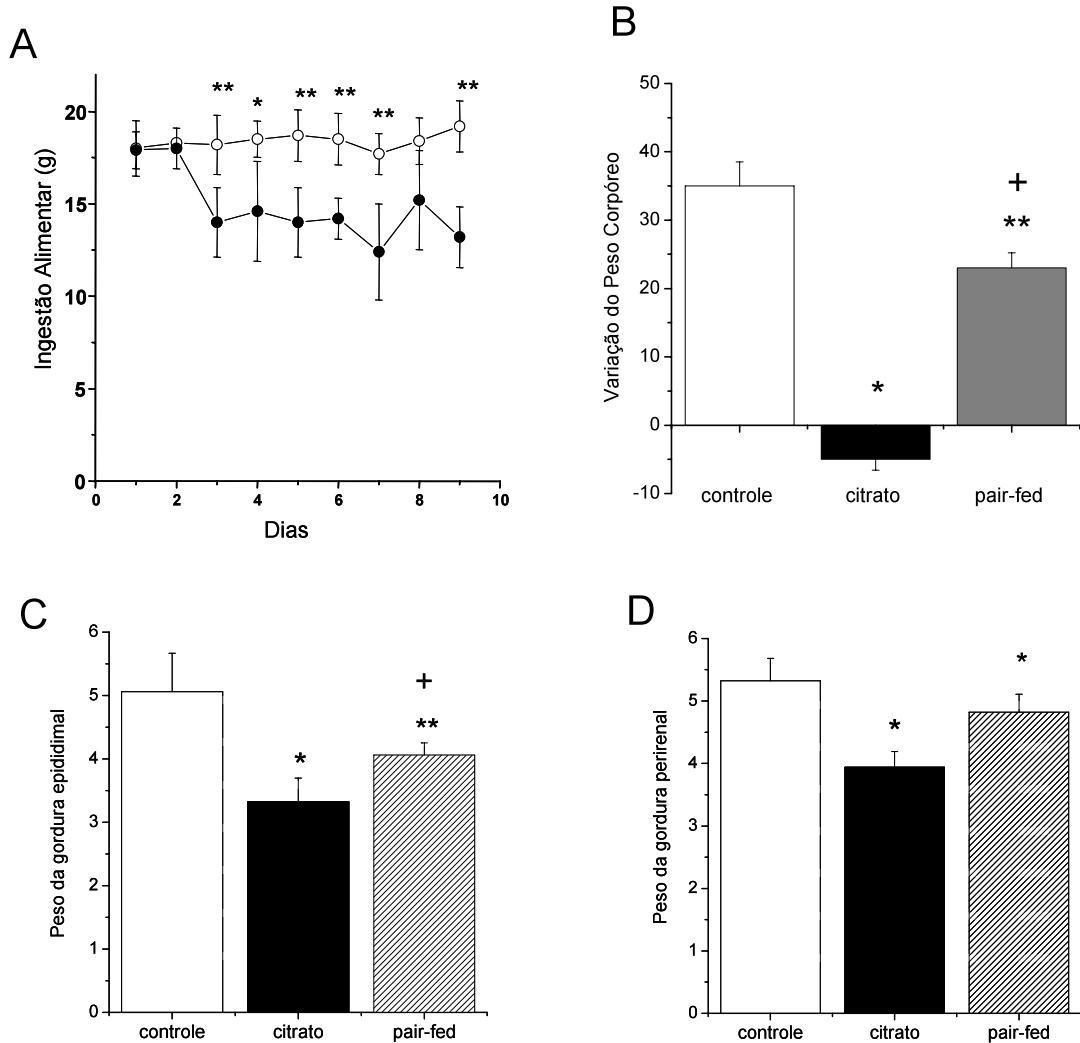


Figura 03 – Efeito do citrato (20 nmoles) durante 7 dias consecutivos na ingestão alimentar diária (A), na variação do peso corpóreo (B) e no peso do tecido adiposo epididimal (C) e perirenal (D). Os animais receberam citrato (ICV) ou solução salina (ICV) (controle) diariamente às 18:00 h com os animais mantidos com ração *ad libitum*. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 8 ratos/tratamento. Em A \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$  para os grupos controles versus citratos. Nos gráficos B, C e D \*  $P \leq 0,05$  citrato versus controle, \*  $P \leq 0,05$  para pair fed versus controle e +  $P \leq 0,05$  para pair fed versus controle.

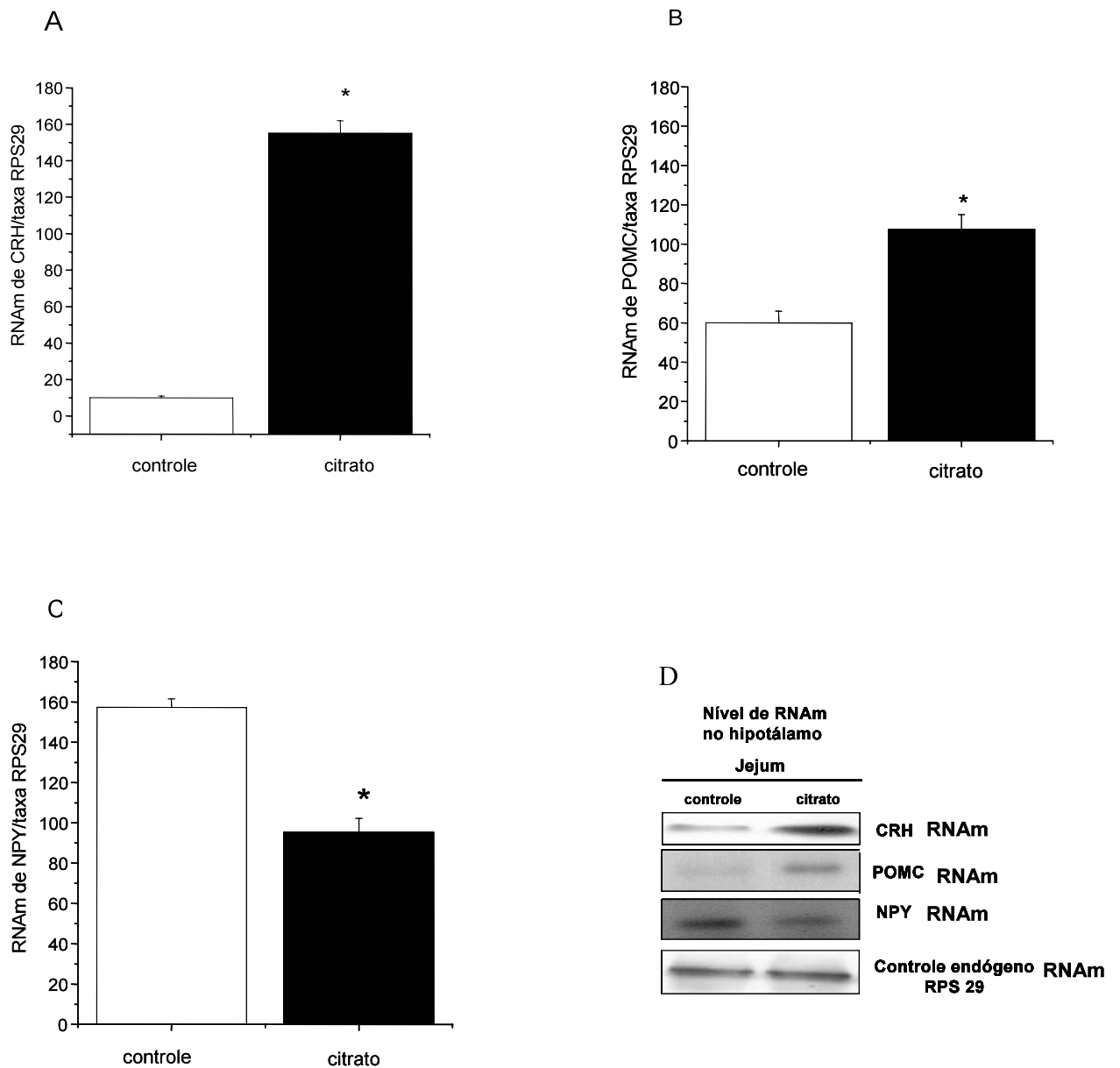


Figura 04 – Efeito da administração de citrato via ICV no nível de RNAm de CRH, POMC e NPY em ratos mantidos em jejum. O citrato ou solução salina (controle) foi administrado 30 minutos antes da extração do hipotálamo. O nível de RNAm de CRH (A), POMC (B) e NPY (C) no hipotálamo de ratos do grupo controle e tratados com citrato foi normalizado utilizando a RNAm da proteína RPS29. (D) blot representativo das bandas em eletroforese de agarose. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 5 ratos/tratamento \*  $P \leq 0,05$  para o grupo citrato versus o grupo controle.

Tabela I: Efeito do citrato (ICV) na concentração de insulina no sangue e nos níveis de corticosterona no plasma. O nível de insulina (pmol/l) e corticosteron (ng/ml) foi determinado após diferentes tempos de administração de citrato. Os valores representam média  $\pm$  SD de 5 animais. \*  $P \leq 0,05$  para o grupo citrato versus o grupo controle.

Tempo (min)	Insulina (pmol/l)	Corticosterona (ng/ml)
	<b>Citrato (ICV)</b>	<b>Citrato (ICV)</b>
<b>Basal</b>	8.5 $\pm$ 2.0	197,2 $\pm$ 45,2
<b>10 min após citrato</b>	9.3 $\pm$ 1.3	115,8 $\pm$ 39,6*
<b>30 min após citrato</b>	8.7 $\pm$ 2.5	112,2 $\pm$ 38,0*
<b>60 min após citrato</b>	8.8 $\pm$ 1.9	118,6 $\pm$ 45,8*

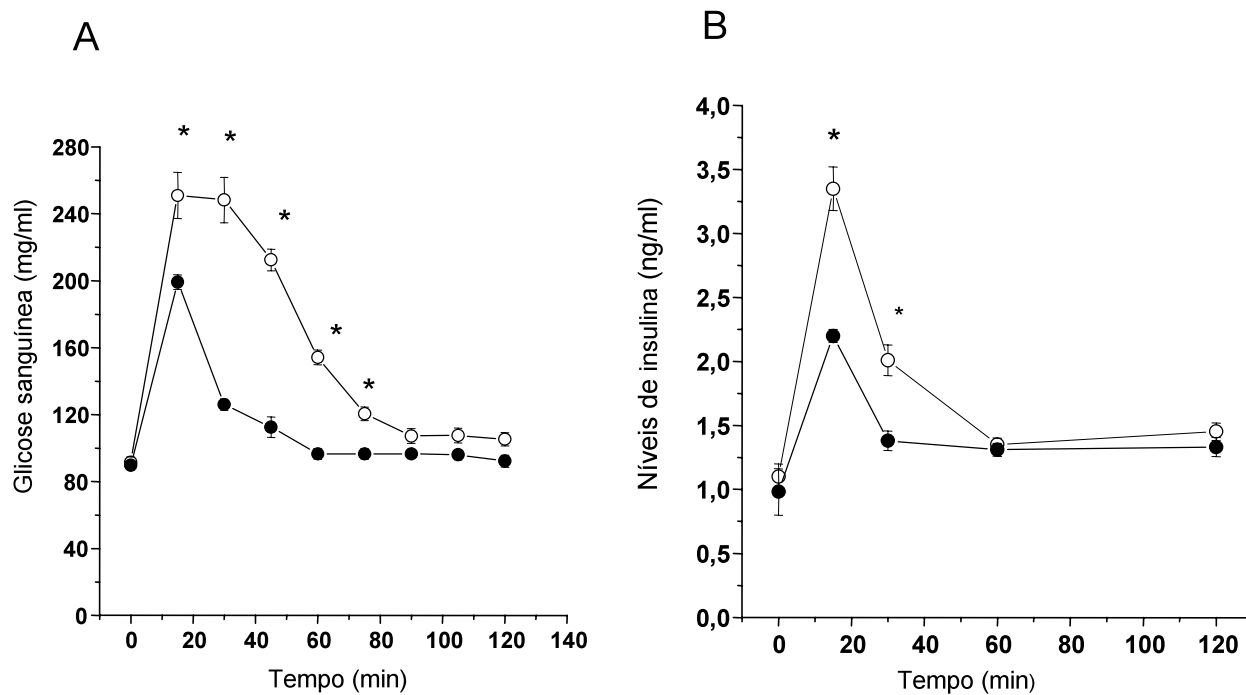


Figura 05 – Avaliação do efeito do citrato no teste de tolerância a glicose intraperitoneal (GTTip) de ratos previamente mantidos em jejum tratados com salina (controle O) e tratados com 20 nmoles de citrato via ICV (●). A coleta do sangue foi iniciada 30 minutos após o tratamento com citrato ou salina. A glicose foi administrada por via IV 30 minutos após o tratamento com citrato em uma única dose de 2.0 g/kg peso corpo. Os resultados representam média  $\pm$  SD de 5 ratos/tratamento. \*  $P \leq 0,05$  para o grupo citrato versus controle.



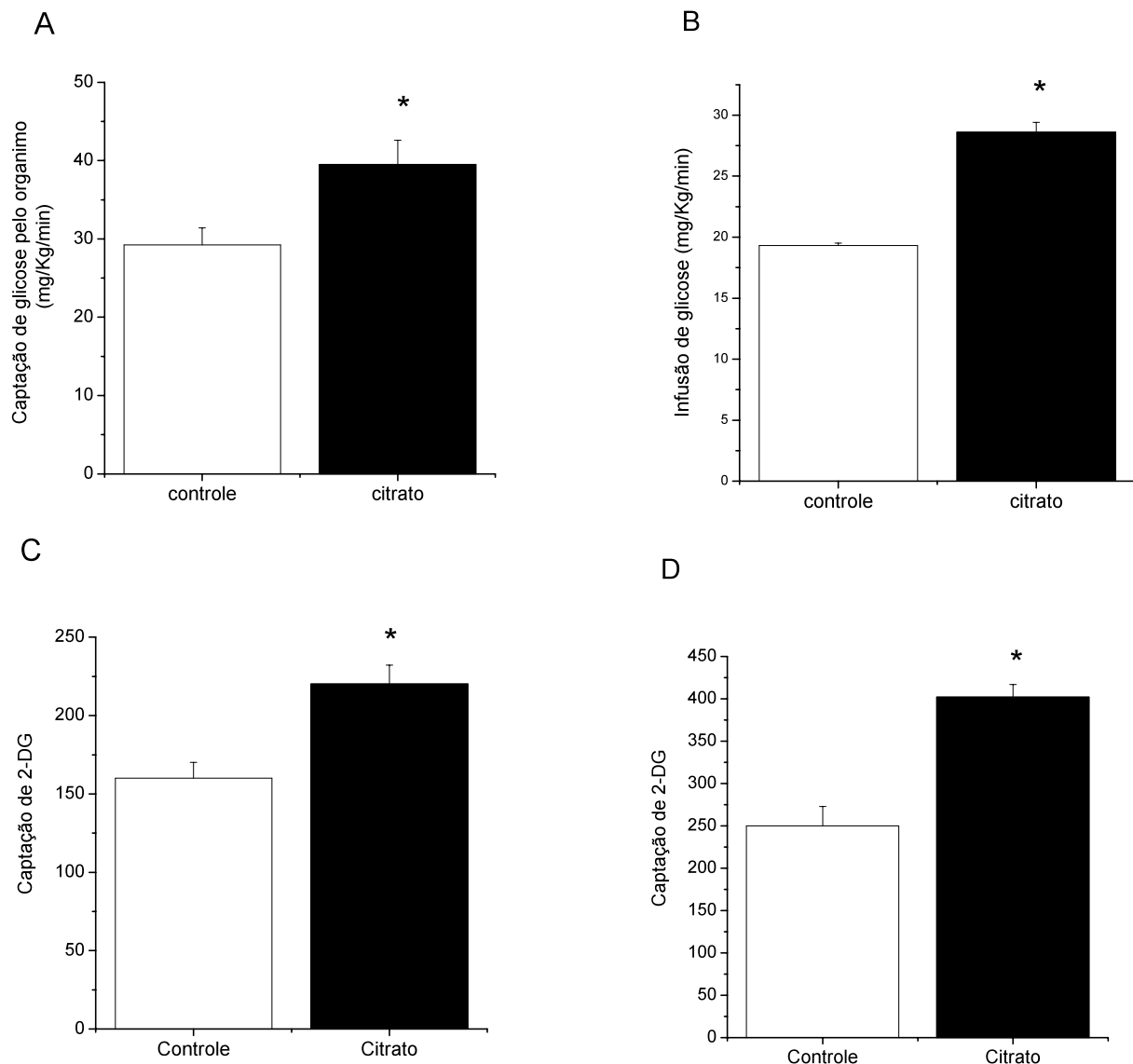


Figura 06– Efeito da administração de citrato via ICV na captação de glicose corpórea (A), na taxa de infusão da glicose (B) e na captação de 2- [<sup>3</sup>H] - deoxiglicose (2-DG) pelo tecido adiposo epididimal (C) e pelo músculo esquelético (D) (11 mol/g/min). A insulina foi infundida a uma taxa constante de 3,6 un/Kg/min em ratos submetidos à jejum prévio de 8 h. Os animais foram divididos em 2 grupos: controle (salina-ICV) e citrato (20 nnoles de citrato-ICV) 30 min antes do início do clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. Os resultados representam média ± SD de 5 ratos/tratamento. \*  $P \leq 0,05$  para o grupo citrato versus controle.

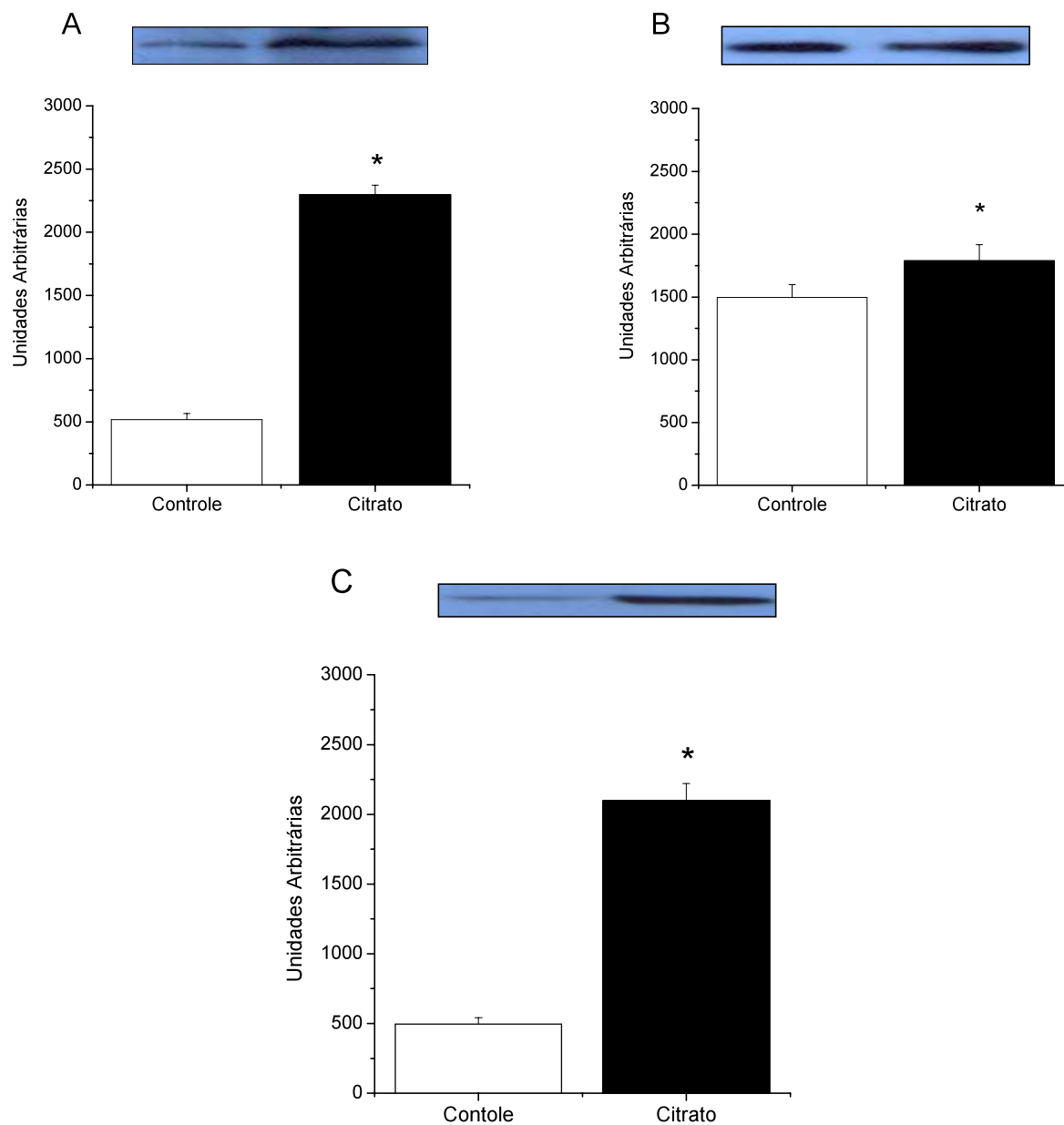


Figura 7 – Efeito da administração de citrato via ICV na expressão do GLUT4 e sua distribuição subcelular no tecido adiposo epididimal. Extrato total (A), Fração citosólica (B) e Fração de membrana (C). A expressão da proteína foi determinada após injeção de 20 nmoles de citrato (ICV) 30 min antes da aplicação de insulina na veia cava (200  $\mu$ l,  $10^{-6}$ M). Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 03 experimentos independentes de um total de 5 ratos/tratamento. Os blots foram quantificados por densitometria óptica (software Scion Corporation). \*  $P \leq 0,05$  para o grupo citrato versus controle.

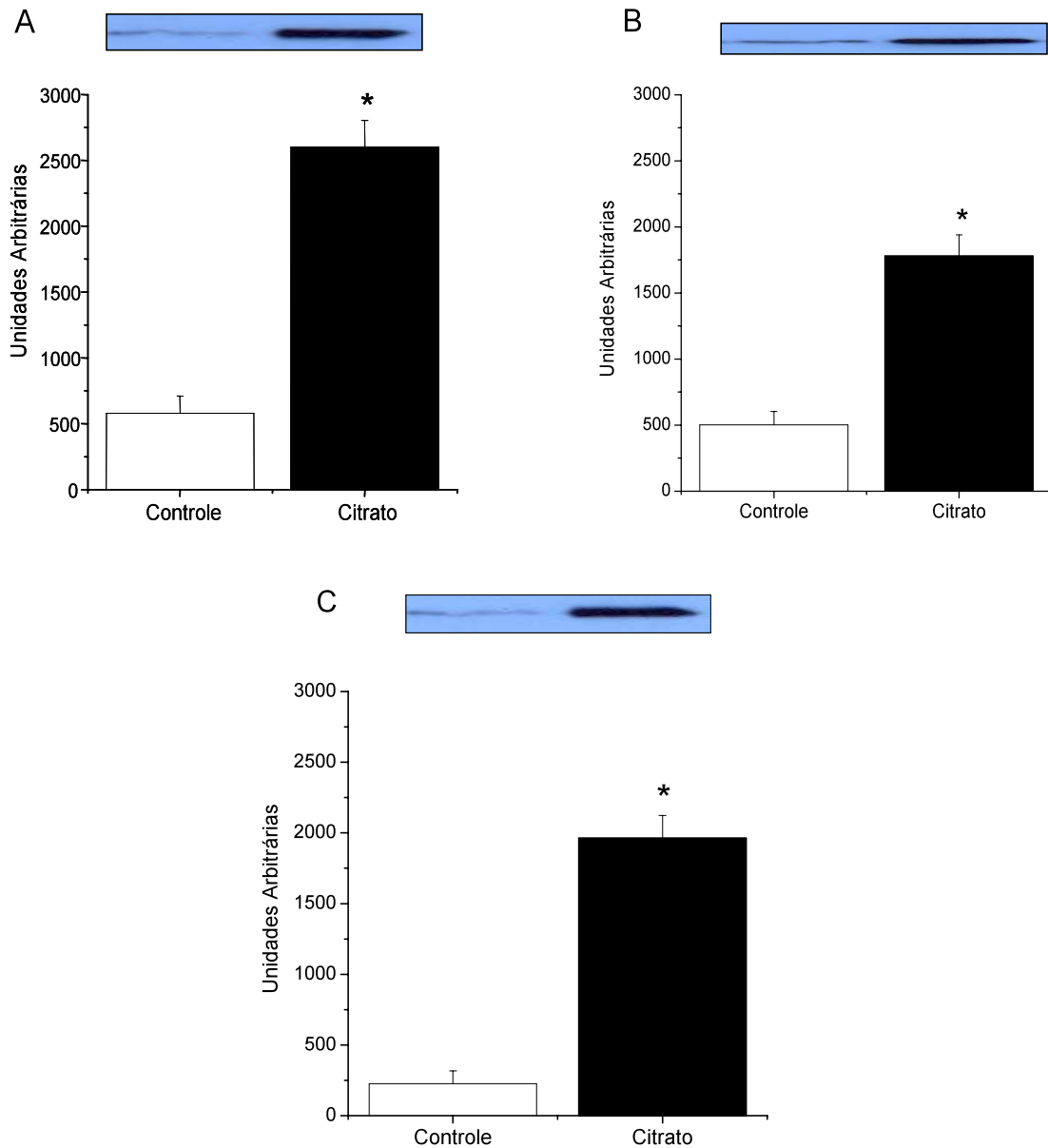


Figura 8 – Efeito da administração de citrato via ICV na expressão do GLUT4 e sua distribuição subcelular na musculatura esquelético (músculo *soleus*). Extrato total (A), Fração citosólica (B) e Fração de membrana (C). A expressão da proteína foi determinada após injeção de 20 nmoles de citrato (ICV) 30 min antes da aplicação de insulina na veia cava (200  $\mu$ l,  $10^{-6}$ M). Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 03 experimentos independentes de um total de 5 ratos/tratamento. Os blots foram quantificados por densitometria óptica (software Scion Corporation). \*  $P \leq 0,05$  para o grupo citrato versus controle.

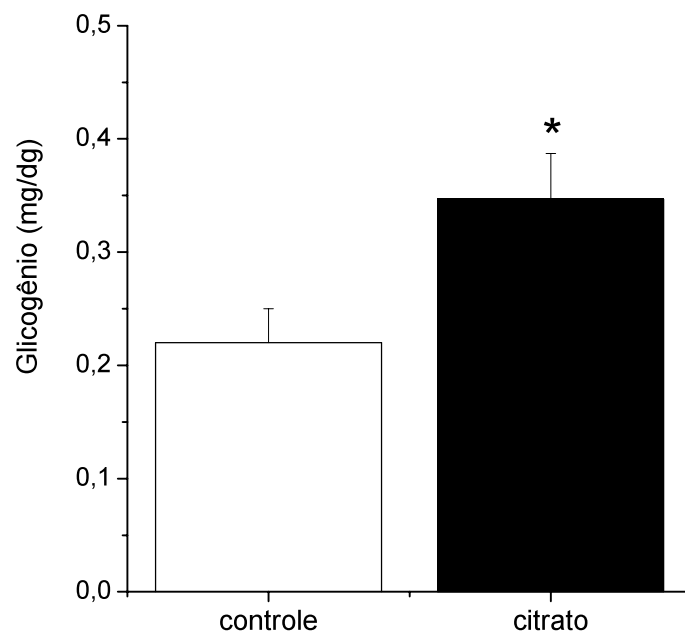


Figura 9 – Efeito do citrato no nível de glicogênio muscular. O efeito do citrato foi observado após 7 dias de tratamento (citrato ICV, aplicado às 18:00h) com os animais mantidos com ração *ad libitum*. Os tecidos foram preparados como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados representam média  $\pm$  SD de 5 ratos/tratamento. \*  $P \leq 0,05$  para os grupo citrato versus controle.

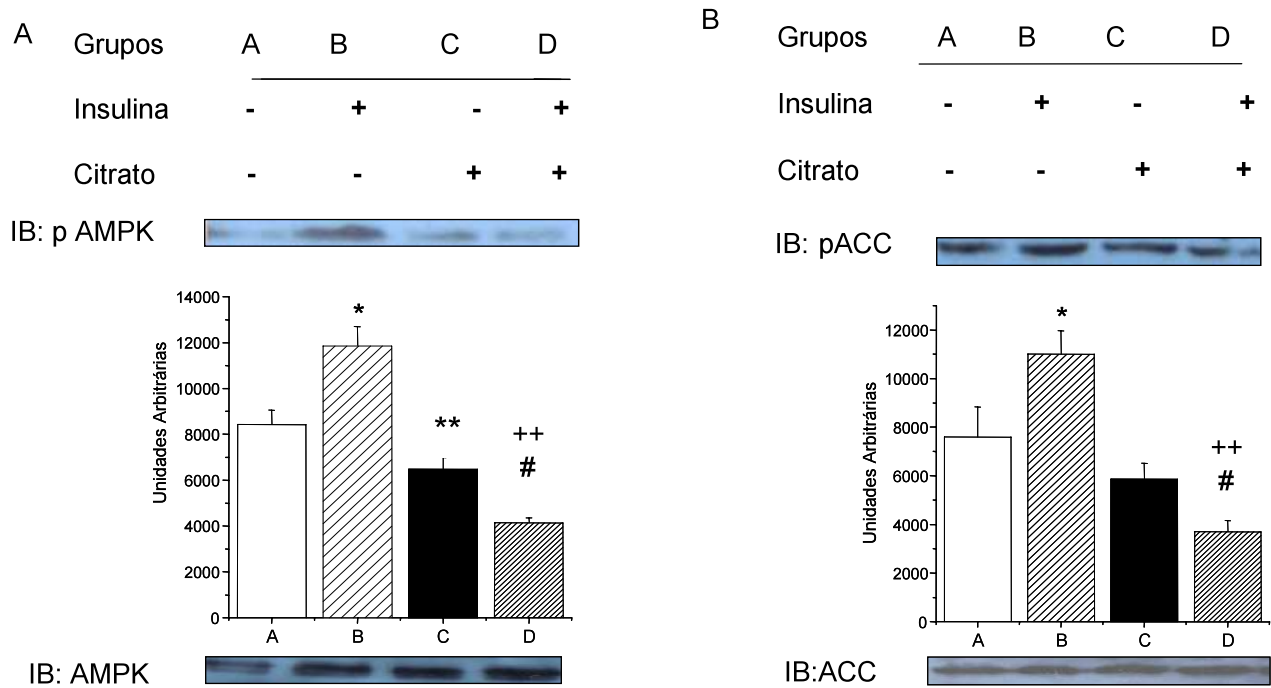


Figura 10 – Efeito da administração de citrato (20 nnoles) via ICV na fosforilação das proteínas AMPK (A) e ACC (B) no tecido adiposo epididimal. O experimento foi realizado em ratos submetidos ao jejum prévio de 10h e tratados com injeção ICV de salina ou citrato 30 minutos antes da extração do tecido. A insulina quando necessária foi administrada na veia cava (200  $\mu$ l,  $10^{-6}$ M). Os resultados representam média  $\pm$  SD de 5 ratos/tratamento. Os blots foram quantificados por densitometria óptica pelo Software Scion Corp.  $P \leq 0,05$ : \* B vs A, # D vs C, \*\* C vs A, ++ D vs B.

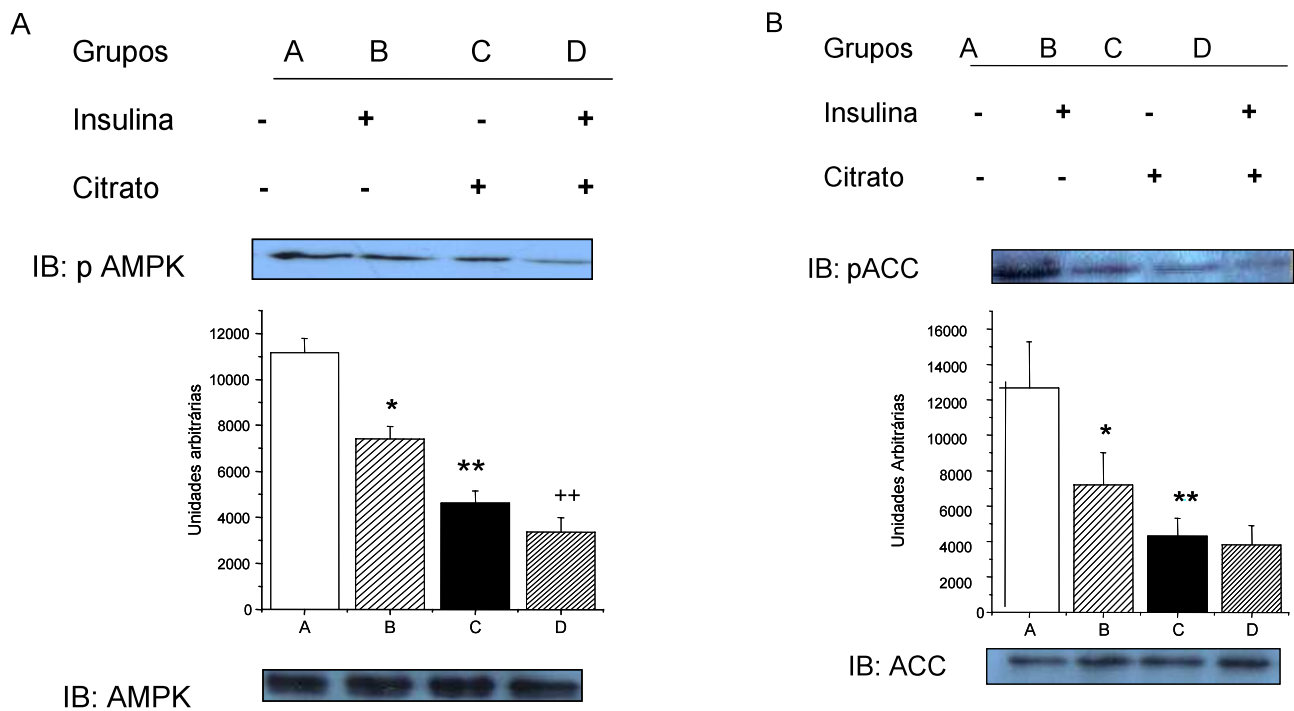


Figura 11 – Efeito da administração de citrato (20 nnoles) via ICV na fosforilação das proteínas AMPK (A) e ACC (B) na musculatura esquelética (músculo *soleus*). O experimento foi realizado em ratos submetidos ao jejum prévio de 10h e tratados com injeção ICV de salina ou citrato 30 minutos antes da extração do tecido. A insulina quando necessária foi administrada na veia cava (200  $\mu$ l,  $10^{-6}$ M). Os resultados representam média  $\pm$  SD de 5 ratos/tratamento. Os blots foram quantificados por densitometria óptica pelo Software Scion Corp.  $P \leq 0,05$ : \* B vs A, \*\* C vs A, ++ D vs B.

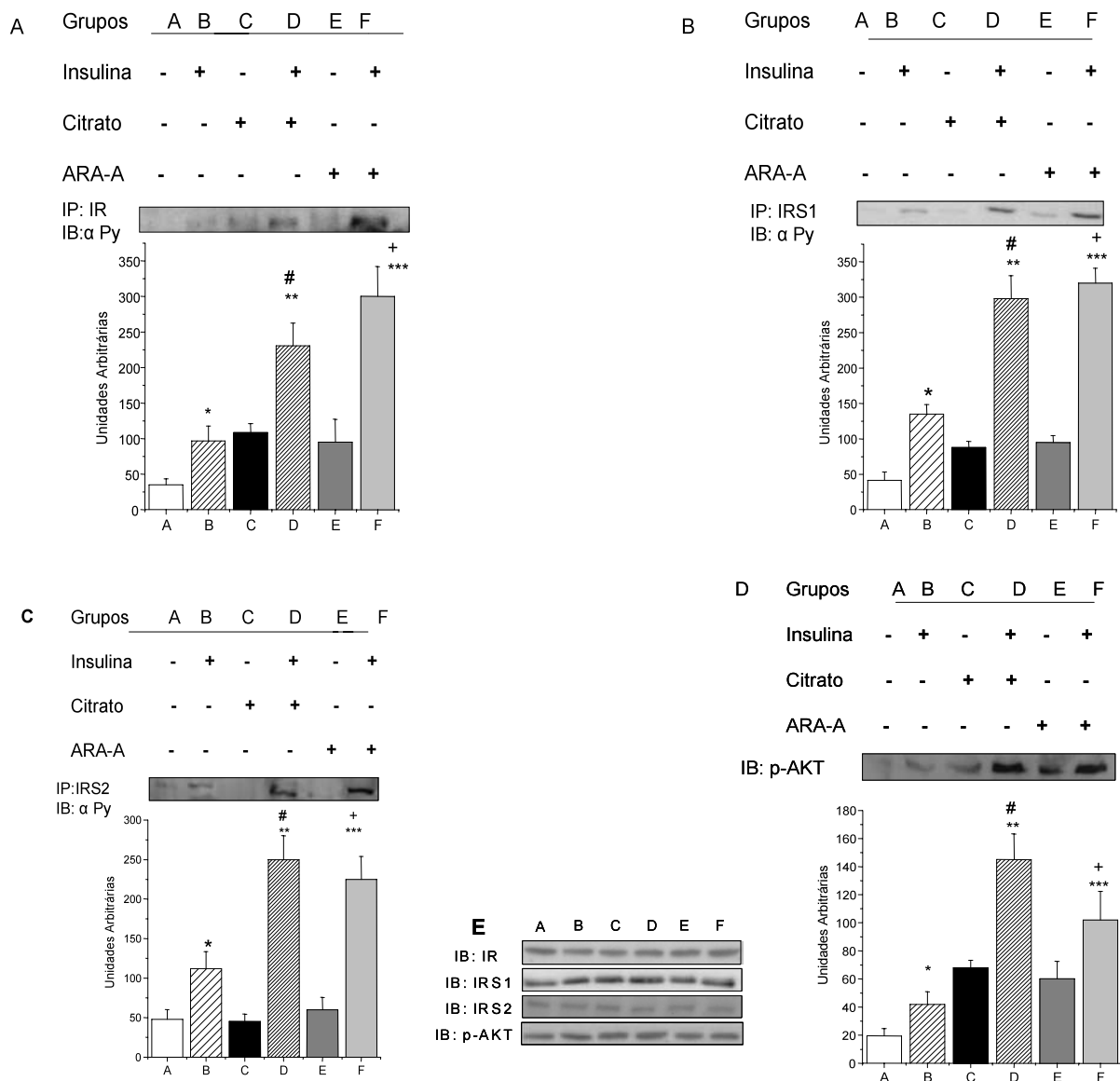


Figura 12 – Efeito da administração de citrato (20 nmoles) na ativação estimulada (4 nmoles de insulina, IV) da via de transdução do sinal da insulina no tecido adiposo epididimal de ratos submetidos ao jejum prévio. (A) Fosforilação do IR, (B) fosforilação do IRS1, (C) fosforilação do IRS2, (D) fosforilação da AKt e (E) extratos totais. Os resultados foram normalizados pelos imunoblots da expressão das proteínas não fosforiladas (E). O efeito do citrato foi avaliado na ausência (grupos A, C e E) e presença (grupos B, D e F) da insulina (4 nmoles, IV). O efeito do ARA-A (2 nmoles, ICV) também foi avaliado na ausência e presença da insulina. Os resultados representam media  $\pm$  SD de 5 animais/tratamento. \*  $P \leq 0,05$  para B vs A; \*\*  $P \leq 0,05$  para D vs C, \*\*\*  $P \leq 0,05$  para F vs E, #  $P \leq 0,05$  para D vs B, +  $P \leq 0,05$  para F vs B.

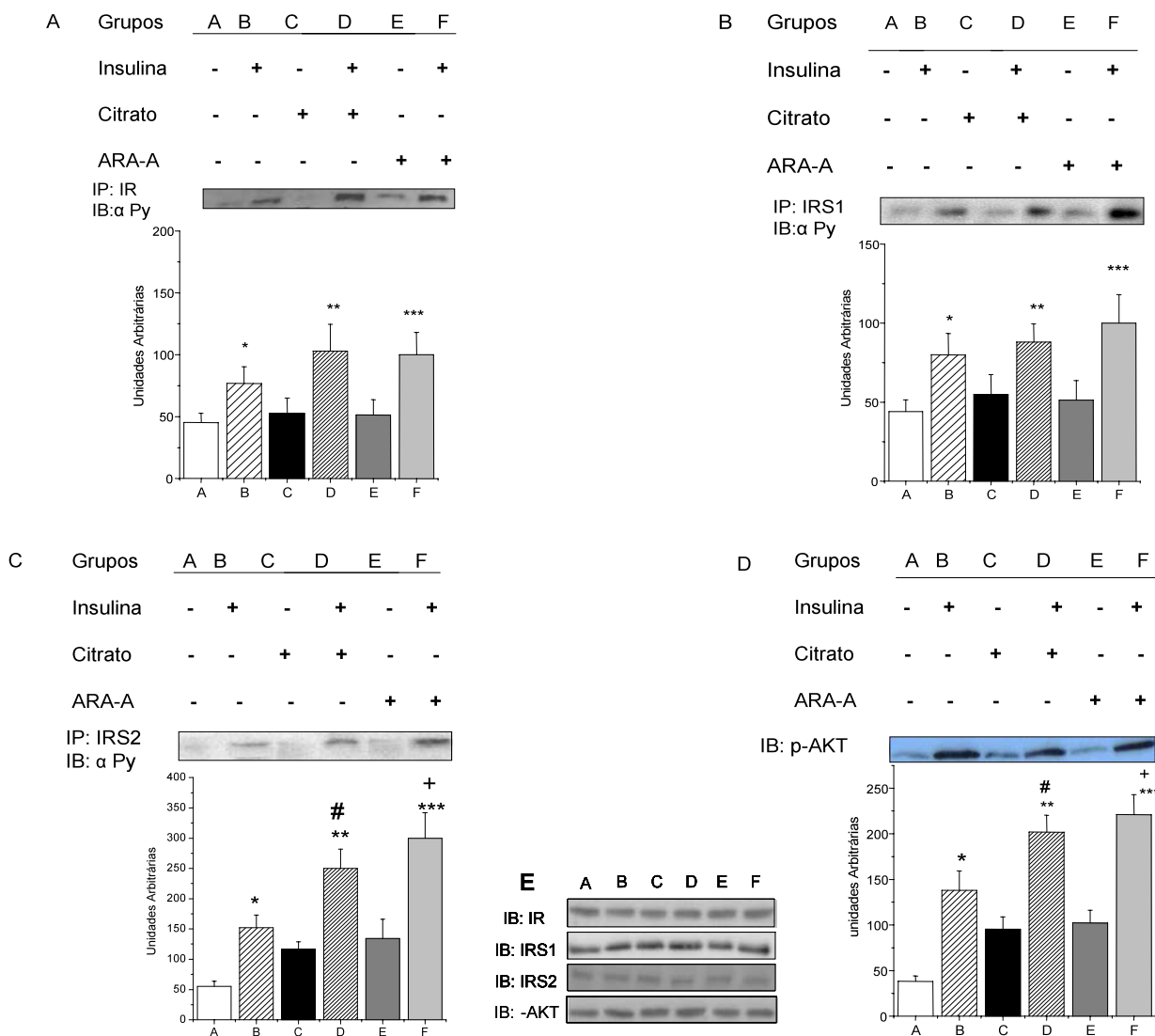


Figura 13 – Efeito da administração de citrato (20 nmoles) na ativação estimulada (4 nmoles de, insulina, IV) da via de transdução do sinal da insulina na musculatura esquelética (músculo soleus) de ratos submetidos ao jejum prévio (8:00 h). (A) Fosforilação do IR, (B) fosforilação do IRS1, (C) fosforilação do IRS2, (D) fosforilação da AKt e (E) extratos totais. Os resultados foram normalizados pelos imunoblots da expressão das proteínas não fosforiladas (E). O efeito do citrato foi avaliado na ausência (grupos A, C e E) e presença (grupos B, D e F) da insulina (4 nmoles, IV). O efeito do ARA-A (2 nmoles, ICV) também foi avaliado na ausência e presença da insulina. Os resultados representam media  $\pm$  SD de 5 animais/tratamento. \*  $P \leq 0,05$  para B vs A; \*\*  $P \leq 0,05$  para D vs C, \*\*\*  $P \leq 0,05$  para F vs E, #  $P \leq 0,05$  para D vs B, +  $P \leq 0,05$  para F vs B.



## **Discussão:**

A OMS apontou a obesidade, como um dos 10 maiores problemas de saúde entre os países ocidentais. Um estudo realizado em 2006 (De Brito et al., 2006), que avaliou indivíduos de diferentes regiões do país mostrou que cerca de 30% da população brasileira é obesa. Este estudo também mostrou que na região Nordeste o índice de massa corpórea (IMC) é menor em comparação as regiões Sudeste e Sul (De Brito Gomes et al., 2006). A presença de sobrepeso e obesidade exerce influência considerável na elevada morbidade e mortalidade das doenças associadas a este quadro clínico.

Entre os problemas decorrentes do ganho de peso, a diabetes vem ganhando importância (Erberly et al., 2003). No Brasil em particular isto foi enfatizado com recentes trabalhos que demonstram que 7,9% das internações em um hospital universitário foram derivadas do diabetes e suas complicações. Relatos do Sistema Único de Saúde (SUS) mostraram que o diabetes é a quinta indicação de hospitalização no Brasil e está entre as 10 causas de mortalidade no país (DATASUS, 2004). No Brasil o número de diabéticos no ano de 2006 era de cerca de 5 milhões de indivíduos e com uma estimativa de chegar a 11,6 milhões em 2025 (Dados da OMS, 2006).

A obesidade é fruto da interação de diversos fatores. A origem monogênica desta doença representa não mais de 5 % de todos os casos de obesidade. A susceptibilidade à obesidade e ao ganho de peso é largamente determinada por uma complexa interação entre genes, estilo de vida e dieta. O ganho de peso que resulta

em obesidade é caracterizado por um longo tempo de balanço energético positivo, que leva a um aumento no estoque e no tamanho do tecido adiposo (Van Schothorst et al., 2005).

O tecido adiposo não é simplesmente um estoque de gordura como se acreditava, mas um tecido dinâmico que constantemente se comunica com outros tecidos importantes na homeostase da glicose, incluindo fígado, músculo e centros do apetite no cérebro. Grandes avanços foram realizados na compreensão dos sinais químicos desenvolvidos por estes órgãos. Atualmente, é conhecido que problemas na comunicação estabelecida entre estes tecidos pode afetar a homeostase da glicose e contribuir para resistência à insulina, um precedente para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (Evans et al., 2004).

No sistema nervoso central, o hipotálamo recebe sinais nutricionais e hormonais, como a leptina e insulina, e estes sinais são integrados, traduzidos e através de sinais eferentes limitam a entrada de nutrientes endógenos e exógenos para a circulação (Obici et al., 2003). Assim, logo após a ingestão alimentar, os níveis de glicose e insulina plasmáticos estão aumentados, levando a ativação dos receptores da insulina (IR) nos neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo. O mesmo mecanismo é atribuído à leptina, a partir da sua ligação aos receptores hipotalâmicos (Schwartz et al., 2000). A partir da interação destes hormônios com seus respectivos receptores, os efeitos desencadeados por eles sobre a expressão dos neuropeptídeos são conhecidos. No entanto, a ação central destes hormônios é capaz de inibir a proteína AMPK nas múltiplas regiões hipotalâmicas (Kahn et al., 2004).

Esta proteína é uma quinase ativada por AMP que pode fosforilar proteínas que participam de diferentes processos celulares (Yu et al., 2003). Tem sido atribuído à

ela a capacidade de regular os níveis de ATP celular e agir como um componente crucial na manutenção da homeostase energética dentro da célula, mediando a adaptação celular frente às variações ambientais (Carling, 2004).

Neste trabalho, foi de particular interesse o efeito desta proteína sobre a síntese de malonil-CoA. Este intermediário metabólico é produzido no citoplasma como precursor da síntese de ácidos graxos e tem efeito inibitório sobre a CPT-1, que é responsável pela entrada de ácido graxo na mitocôndria. A síntese de malonil-CoA ocorre através da catálise exercida pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), uma enzima alvo da AMPK (Folmes & Lopaschuk, 2007). A ACC é inibida pela fosforilação (Ser79) pela AMPK e ativada pela desfosforilação e pela ligação de um intermediário metabólico do ciclo de Krebs, o citrato (Saha & Ruderman, 2003). Como a proteína AMPK é ativada em condições de baixa disponibilidade de energia na célula isso leva a inibição da ACC, e conseqüente inibição da síntese de malonil-CoA. Este mecanismo permite a célula economizar energia.

De acordo com Schwartz et al. (2000) há também fortes indícios entre a conexão da síntese de ácidos graxos no hipotálamo e a inibição da ingestão alimentar. A administração de cerulenina ou do C75 (ICV), ambos potentes inibidores da FAS (ácido graxo síntase), em camundongos normais e obesos, rapidamente diminuiu a ingestão alimentar e a massa adiposa (Loftus et al., 2000). De acordo com Cha et al. (2004) o uso de C75 (ICV) preveniu que o jejum estimulasse o aumento de NPY e AgRP.

Neste mecanismo bioquímico o citrato formado no interior da mitocôndria, quando em excesso, atravessa a membrana mitocondrial. No citoplasma a citrato liase converte o citrato em acetil-CoA e oxaloacetato (Willoughby et al., 1989). No

entanto, com a descoberta de um transportador de citrato na membrana celular (Inoue et al., 2002) passamos a questionar se o citrato citoplasmático poderia ser obtido também a partir do plasma sanguíneo. A fonte de nutrientes para as células nervosas é o liquor e o citrato é encontrado em maior concentração neste ambiente que no plasma (Hoffman et al., 1993). Como este transportador foi descrito na maioria dos neurônios a possibilidade de o citrato ser obtido do licor e modular os mecanismos descritos acima foi investigada. Para responder esta questão o citrato foi administrado via ICV em ratos e diferentes aspectos da bioquímica e fisiologia foram avaliados.

A avaliação da ingestão alimentar nos ratos tratados com citrato nos mostrou que o citrato apresenta importante efeito anorexígeno. O efeito obtido foi similar em intensidade ao obtido com o uso de ARA-A (um inibidor competitivo da AMPK) e de insulina (Roman et al., 2005). O efeito sobre o sinal de saciedade foi acompanhado por queda na fosforilação da AMPK e ACC hipotalâmica. O tratamento por 7 dias promoveu significativa queda no ganho de peso e perda de massa de tecido adiposo. O efeito do citrato administrado no hipotálamo pode ser observado até mesmo em animais que foram previamente mantidos em jejum. Nestes animais foi observado a redução na ingestão de ração e na fosforilação da AMPK induzida pelo jejum. Apesar da concentração de malonil-Coa não ter sido avaliada no hipotálamo dos animais que receberam citrato via ICV, nossos dados indicam que na presença de citrato a síntese de malonil-CoA é elevada, resultando nos efeitos observados. Até porque a condição por nós utilizada fornece o precursor do malonil-CoA e ainda ativa de maneira alostérica a ACC. Adicionalmente, nesta condição a enzima inibitória da ACC encontra-se inibida.

Schwartz et al. (2000) descreveu a importância da formação de malonil-CoA e a síntese de ácidos graxos para o controle do apetite. Contudo, podemos ver que a inibição da AMPK parece ter papel fundamental nos eventos observados desde que ela é responsável pela inibição da ACC. Outros autores também têm demonstrado que a modulação da atividade da AMPK hipotalâmica resulta em alteração da fome e do peso corpóreo (Minokoshi et al., 2004; Andersson et al., 2004; Namkoong, et al., 2005). O mecanismo que promove a inibição da AMPK pelo citrato não é conhecido, mas um efeito indireto pode ser atribuído ao citrato. Este efeito pode ser decorrente do aumento da disponibilidade de energia na célula após administração de citrato. Assim, nos parece razoável afirmar que o citrato poderia inibir indiretamente a AMPK e ativar a ACC, resultando em maior produção de malonil-CoA. Contudo, a diferença de perda de peso observada entre os animais do grupo citrato e do grupo *pair fed* ao citrato nos sugere que o citrato foi capaz de promover não só um sinal de saciedade, mas também aumentar o gasto energético. Interessantemente, a leptina atua no sistema nervoso central e promove aumento de gasto energético e menor ingestão de ração (Sato et al., 1998). Em comum, o citrato e leptina têm o fato de ambos inibirem a AMPK no hipotálamo.

Vários estudos têm mostrado que a proteína AMPK hipotalâmica está envolvida com a homeostase energética. Para isso, é importante que a modulação da AMPK no hipotálamo resulte em um sinal eferente capaz de ativar mecanismos tais como: captação de glicose e mobilização das reservas energéticas principalmente no tecido adiposo. Neste sentido, os estudos de Minokoshi et al. (1999, 2002) mostraram que a leptina administrada via ICV foi capaz de modular a

captação de glicose e a atividade da AMPK na musculatura.

A modulação da homeostase da glicose é resultado da interação entre fatores hormonais e nutricionais. Contudo, tanto o pâncreas como os tecidos alvos da insulina também recebem sinais adrenérgicos que mantêm a concentração de glicose no sangue em uma faixa bem estreita (Ribes et al., 1989; Steffens et al., 1984). Neste mecanismo o sistema nervoso central desempenha papel importante através de receptores adrenérgicos e a regulação da atividade simpato-adrenal (Scheurink & Steffens, 1990). O citrato quando administrado por via ICV também foi capaz de modular positivamente a homeostase da glicose. O efeito foi demonstrado através da melhora no teste de tolerância a glicose e no clamp euglicêmico/hiperinsulinêmico. A taxa de infusão de glicose e a captação de 2-deoxi-glicose pelo tecido adiposo epididimal e pelo músculo esquelético *soleus*, foram significativamente melhores nos animais tratados com citrato. A análise dos elementos da via de sinalização da insulina no tecido adiposo e muscular mostrou maior ativação após estímulo com insulina em animais previamente tratados com citrato por via ICV. Este efeito foi reforçado pela maior presença de GLUT4 na fração de membrana dos animais tratados com citrato, tanto para o tecido adiposo como para o músculo. Nestes animais o nível de glicogênio muscular foi maior quando o tratamento com citrato foi realizado durante 7 dias consecutivos. Estes dados indicam um efeito mais robusto da insulina de estimular a síntese e inibir a degradação do glicogênio ao longo do tratamento. Desde que estes efeitos foram observados sem a alteração dos níveis de insulina circulante é provável que a ativação do sistema nervoso simpático possa ter ocorrido. De acordo com Morris & Malbon (1999) a interação entre os sinais promovidos por proteínas tirosinas quinases e as vias ligadas a proteínas-G é um

ponto importante de convergência. A expressão constitutiva da proteína-G $\alpha$ i2 aumenta a sensibilidade a insulina e translocação de GLUT4 para a membrana (Chen et al., 1997; Song et al., 2001). Tao et al. (2001) também mostraram que a presença de proteína-G $\alpha$ i2 suprime a expressão da proteína tirosina fosfatase 1B. Apesar desta possibilidade não ter sido investigada neste estudo, o fato do nível de insulina não ter se alterado, o nível de cortisol ter diminuído e a administração intraperitoneal de um  $\beta$ -antagonista bloquear os efeitos do citrato sobre a atividade de algumas proteínas hepáticas (dados não mostrados), torna esta explicação viável.

A captação de glicose também pode ser estimulada por mecanismos independentes da presença da insulina. A proteína AMPK tem sido relacionada ao transporte de glicose no músculo esquelético via GLUT4, em resposta a diversas formas de estresse celular, incluindo exercícios, hipoxia e um aumento na relação AMP:ATP. De acordo com Yamaguchi et al. (2005) nos adipócitos 3T3-L1 a AMPK ativa a translocação de GLUT4 por uma via de sinalização distal da PI3K. Para avaliar esta possibilidade, a fosforilação da AMPK foi investigada tanto no tecido adiposo como no tecido muscular de ratos que receberam citrato via ICV. O tratamento diminuiu a fosforilação da AMPK no tecido adiposo e inibiu o efeito da insulina de ativar a AMPK. No tecido muscular, o efeito do citrato em diminuir a fosforilação basal da AMPK foi maior e potencializou o efeito da insulina. Desta maneira, a possibilidade de o citrato ser o responsável pela ativação da AMPK e conseqüente melhora na homeostase da glicose foi descartada. Contudo, este efeito foi observado em estudo realizado por Minokoshi et al. (2002) que demonstrou que a leptina ativou a AMPK muscular e estimulou a oxidação de ácidos graxos após a ação

central deste hormônio. Como a leptina atua no hipotálamo e diminui a fosforilação da AMPK, assim como o observado para o citrato, seria esperado que o resultado periférico fosse o mesmo. No entanto, as proteínas intracelulares ativadas pela leptina, a partir de seu receptor na membrana, são diferentes e o tempo em que o efeito foi observado foi de cerca de 120 minutos após a administração da leptina, enquanto que em nosso modelo os animais foram sacrificados após 30 minutos.

No tecido adiposo, a proteína AMPK participa do controle da lipólise e lipogênese. A lipólise é iniciada pela ATGL (lipase de triacilglicerol do adiposo) que catalisa a hidrólise do TG gerando DG (diacilglicerol), para a subsequente reação da HSL (lipase hormônio sensível), que converte DG em MG (monoacilglicerol) e ácidos graxos (Miyoshi et al., 2007). A atividade da HSL é controlada por uma variedade de sinais hormonais e neurais. Agentes lipolíticos, como a epinefrina e isoprenalina, aumentam os níveis intracelular de cAMP e ativam a proteína quinase A (PKA), que é responsável pela fosforilação e ativação da HSL (Stralfors et al., 1984). A translocação da HSL para as gotículas de gordura é modulada pela perilipina A, abundante nos estoques de gordura, que também é ativada pela fosforilação da PKA (Daval et al., 2005). A lipólise em adipócitos é estimulada primariamente por sinais que ativam a PKA, em contraste a HSL, ATGL não é alvo da PKA e sua presença no estoque de gordura em estado basal ou ativa, exclui um mecanismo de translocação direcionado, como ocorre com a HSL (Miyoshi et al., 2007). De acordo com Miyoshi et al. (2007), a PKA fosforila a HSL nos resíduos de Ser 563 e 660, ativando a lipólise. Contudo, Daval et al., (2005) mostraram que a PKA atua muito mais no sítio Ser 659 e 600 do que no resíduo Ser 563. Como controle negativo da atividade da HSL, a AMPK é responsável pela fosforilação da Ser 565. Assim, eventos que resultam na



ativação da AMPK no tecido adiposo promovem um efeito anti-lipolítico. Avaliando a fosforilação da AMPK no tecido adiposo, podemos observar que a insulina induz sua ativação, sinalizando um efeito anti-lipolítico. Por outro lado, na presença de citrato administrado no hipotálamo o efeito da insulina é abolido. Estes resultados nos sugerem que a inibição da AMPK no hipotálamo sinaliza de maneira a impedir o efeito anti-lipolítico da insulina. Esta hipótese é também suportada por dados da literatura que nos mostram que a ação central da leptina, um hormônio inibidor da AMPK hipotalâmica, resulta em maior gasto energético (Kahn et al., 2005). A comparação da perda de peso e da massa adiposa nos ratos tratados por 7 dias com citrato e o grupo *pair fed* nos indica exatamente este efeito modulador da lipólise. No grupo citrato, a menor fosforilação/ativação da AMPK no adiposo permite que a atividade lipolítica possa se desenvolver durante o período de tratamento. Por outro lado, no grupo *pair fed* a ausência do sinal hipotalâmico poderia permitir a atividade anti-lipolítica da insulina durante o período experimental. Assim nos podemos especular que a modulação da via AMPK/ACC hipotalâmica está intimamente ligada ao controle do metabolismo do adipócito.

De acordo com a literatura, muitos trabalhos mostram que o estímulo no sistema nervoso simpático induz a captação de glicose via insulina (Laurent et al., 1998) e a estimulação elétrica da região ventromedial do hipotálamo aumenta a atividade simpática, resultando em um aumento na captação de glicose pelo músculo, sem alteração dos níveis de insulina (Minokoshi et al., 1994). Com estes resultados mais informações foram adicionadas ao complexo sistema que controla a homeostase energética de corpo todo. É indiscutível o importante papel do sistema nervoso central neste mecanismo, mas as regiões hipotalâmicas e as moléculas que

participam deste controle ainda não são totalmente conhecidas. Este estudo traz novos conhecimentos e questionamentos que devem ser investigados para procurar identificar alvos em potenciais para o controle da saciedade e do metabolismo periférico. Neste sentido, as enzimas envolvidas com o metabolismo do citrato são candidatas a novos estudos que poderão responder questões importantes sobre os eventos que precedem a disfunção metabólica que favorece o ganho de peso.

## **Conclusões**

Com base em nossos resultados podemos concluir que a administração de citrato no hipotálamo foi capaz de:

### **Modular a fome:**

- Diminuindo a ingestão alimentar
- Diminuindo a ativação da AMPK hipotalâmica
- Aumentando a expressão de neuropeptídeos anorexigênicos (CRH e POMC)
- Diminuindo a expressão do neuropeptídeo orexigênico (NPY)

### **Modular positivamente a homeostase da glicose:**

- Melhorando a sensibilidade à insulina na periferia
- Melhorando a captação de glicose pelo adiposo e músculo
- Aumentando a expressão de GLUT4 no músculo *soleus* e tecido adiposo epididimal.
- Melhorando a transdução do sinal da insulina no músculo *soleus* e tecido adiposo epididimal.
- Ativando a produção de glicogênio muscular.

## **Referências**

Alquier, T., Kawashima, J., Tsuji, Y., Kahn, B. B Role of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in the impaired counterregulatory response induced by repetitive neuroglucopenia. **Endocrinology.**, 148(3), p.1367-75, 2007.

Abu-Elheiga, L.; Matzuk, M.M.; Abo-Hashema, K. A.; Wakil, S. J. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. **Science**, 291(5513), p. 2613-6, 2001.

Andersson, U.; Filipsson, K.; Abbott, C.R.; Woods, A.; Smith, K.; Bloom, S. R. et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. **J Biol Chem.**, 279, p. 12005-12008, 2004.

Andjelkovic, M.; Alessi, D. R.; Meier, R.; Fernandez, A.; Lamb, N. J.; Frech, M.; Cron, P.; Cohen, P., Lucocq, J. M.; Hemmings, B. A. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. **J Biol Chem.**, 272(50), p. 31515-24, 1997.

An J.; Muoio, D. M.; Shiota, M.; Fujimoto, Y.; Cline, G. W.; Shulman, G.I.; Koves, T. R.; Stevens, R.; Millington, D.; Newgard, C. B. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. **Nat Med.**, 10(3):268-74, 2004.

Air, E. L.; Benoit, S. C.; Clegg, D. J.; Seeley, R. J.; Woods, S. C. Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats. **Endocrinology.**, 143(6), p. 2449-52, 2002.

Araujo, E.P.; De souza, C. T.; Gasparetti, A. L.; Ueno, M.; Boschero, A. C.; Saad, M. J. & Velloso, L. A. Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. **Endocrinol.**, 146(3), p. 1428-1437, 2005.

Baskin, D. G.; Breininger, J. F.; Schwartz, M. W. SOCS-3 expression in leptin-sensitive neurons of the hypothalamus of fed and fasted rats. **Regul Pept.**, 92(1-3), p. 9-15, 2000.

Bjorbaek, C.; Elmquist, J. K.; Frantz, J. D.; Flier, J. S. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. **Mol Cell.**, 4, p. 619-25, 1998.

Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**. 46(1):3-10, 1997.

Boudeau, J.; Scott, J.W.; Resta, N.; Deak, M.; Kieloch, A.; Komander, D.; Hardie, D. G.; Prescott, A. R.; Van Aalten, D. M.; Alessi, D. R. Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. **J Cell Sci.**, 117 (Pt 26), p. 6365-75, 2004.

Bradford, L. W. Problems of ethics and behavior in the forensic sciences. **J Forensic Sci**, 21(4), p. 763-8, 1976.

Bugarith, K.; Dinh, T. T.; Li, A. J.; Ritter, S. Basomedial hypothalamic injections of neuropeptide Y conjugated to saporin selectively disrupt hypothalamic controls of food intake. **Endocrinology**, 146(3), p. 1179-91, 2004.

Carling, D. AMPK. **Curr Biol.**, 14, p. R220, 2004.

Carling, D. The AMP-activated protein kinase cascade: a unifying system for energy control. **Trends Biochem Sci.**, 29, p. 18–24, 2004.

Cascella, T.; Giallauria, F.; Tafuri, D.; Lombarda, G.; Colao, A.; Vigorito, C.;

Orio F. cardiovascular complications of obesity. **Monaldi Arch Chest Dis.**, 66, p. 270-4, 2006.

Cha, S.H.; Hu, Z., Lane, M. D. Long-term effects of a fatty acid synthase inhibitor on obese mice: food intake, hypothalamic neuropeptides, and UCP3. **Biochem Biophys Res Commun.**, 317(2), p. 301-8, 2004.

Chenm, J. F.; Guo, J. H.; Moxham, C. M.; Wang, H. Y.; Malbon, C. C. Conditional tissue-specific expression of Q205L G alpha i2 in vivo mimics insulin action. **J Mol Med.**, 75(4):283-9, 1997.

Cheng, J. T.; Liu, I.M.; Tzeng, T., Tsai, C. C., Lai, T. Y. Plasma glucose-lowering effect of beta-endorphin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Horm Metab Res.**, 34(10), p. 570-6, 2002.

Cheung, C.C.; Clifton, D. K.; Steiner, R. A. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. **Endocrinology.**, 138(10), p. 4489-92, 1997.

Combs, T. P.; Berg, A. H.; Obici, S.; Scherer, P. E. & Rossetti, L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. **J. Clin. Invest.**, 108, p. 1875-1881, 2001.

Culmsee, C.; Monnig, J.; Kemp, B. E.; Mattson, M. P. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. **J Mol Neurosci.**, 17(1):45-58, 2001.

Daval, M.; Diot-Dupuy, F.; Bazin, R.; Hainault, I.; Viollet, B.; Vaulont, S.; Hajduch, E.; Ferre, P.; Foufelle, F. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. **J Biol Chem.**, 280(26), p. 25250-7, 2005.

De Brito Gomes, M.; Gianella, D.; Faria M.; Tambascia, M.; Fonseca, R. M.; Rea, R.; Macedo, G.; Filho, J. M.; Schmid, H.; Bittencourt, A. V.; Cavalcanti, S.; Rassi, N.; Pedrosa, H. Atala, Dib S. Prevalence of type 2 diabetic patients within the targets of care guidelines in daily clinical practice: a multi-center study in Brazil. **Rev Diabet Stud.**, 3(2):82-7, 2006.

Diraison, F.; Parton, L.; Ferre, P.; Fougelle, F.; Briscoe, C. P.; Leclerc, I.,; Rutter, GA. Over-expression of sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP1c) in rat pancreatic islets induces lipogenesis and decreases glucose-stimulated insulin release: modulation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR). **Biochem J**, 378 (Pt 3), 769-78, 2004.

Dulloo, A. G. Spicing fat for combustion. **Br J Nutr.**, 80(6), p. 493-4, 1998.

Elias, C. F.; Saper, C. B.; Maratos-Flier, E.; Lee, C.; Kelly, J.; Hoffman, G. E., Olmman, M. M.; Sakurai, T.; Elmquist, J. K. chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. **J Comp Neurol.**, 402(4), p. 442-59, 1998.

Elmquist, J. K.; Ahima, R. S.; Maratos-Flier, E.; Flier, J. S.; Saper, C. B. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. **Endocrinology**, 138(2), p. 839-42, 1997.

Elmquist, J.; Elias, C. F.; Saper, C. B. from lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. **Neuron.**, 22(2), p. 221-32, 1999.

Evans, J. L, Youngren JF, Goldfine ID. Effective treatments for insulin resistance: trim the fat and douse the fire. **Trends Endocrinol Metab.**, 15(9), p. 425-31, 2004.

Folmes, C.D. & Lopaschuk, G. D. Role of malonyl-CoA in heart disease and

the hypothalamic control of obesity. **Cardiovasc Res.**, 73(2), p. 278-87, 2007.

Flier, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell.**, 116(2), p. 337-50, 2004.

Friedman, J. E.; Caro, J. F.; Pories, W. J.; Azevedo, J. L.; Dohm, G. L. Glucose metabolism in incubated human muscle: effect of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism.**, 43(4), p. 1047-54, 1994.

Friedman, J. E.; Ishizuda, T.; Liu, S.; Farrell, C. J.; Bedol, D.; Ernsberger, P. Anti-hyperglycemic activity of monoxidine: metabolic and molecular effects in obese spontaneously hypertensive rats. **Blood Press.**, 3, p. 32-9, 1998.

Friedman, J. M. Obesity in the new millennium. **Nature**, 404(6778), p. 632-4, 2000.

Guallar-Castillon, P.; Banegas, J. R.; Lopez garcia, E.; Rodríguez-Artalejo, F. association of cardiovascular disease with overweight and obesity in Spain. **Med Clin (Barc.)**, 4118(16), p. 616-8, 2002.

Guy-Grand, D.; Di Santo, J. P.; Henchoz, P.; Malassis-Séris, M.; Vassalli, P. Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. **Eur J Immunol.**, 28(2), p. 730-44, 1998.

Hahn-Windgassen, A.; Nogueira, V.; Chen, C. C.; Skeen, J. E.; Sonenberg, N. & Hay, N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. **J Bio Chem.**, 280, p. 32081-32089, 2005.

Han, S. M.; Namkoong, C.; Jang, P. G.; Park, I. S.; Hong, S. W.; Katakami H.; Chun, S.; Kim, S. W.; Park, J. Y.; Lee, K. U.; Kim, M. S. Hypothalamic AMP-



activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. **Diabetologia**. 48(10):2170-8, 2005.

Havel, P. J. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation. **Exp Biol Med.**, 226(11), p. 963-77, 2001.

Hoffmann, G. F. Quantitative organic acid analysis in cerebrospinal fluid and plasma: reference values in a pediatric population. **J Chromatogr.**, 617, p. 1-10, 1993.

Hu, Z.; Cha, S.H.; Chohnan, S.; Lane, M. D. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100(22):12624-9, 2003.

Hutchinson, D.S. & Bengtsson, T. AMP-activated protein kinase activation by adrenoceptors in L6 skeletal muscle cells: mediation by alpha1-adrenoceptors causing glucose uptake. **Diabetes**, 55 (3), p. 682-90, 2006.

Inoue, K.; Zhuang, L.; Maddox, D. M.; Smith, S. B.; Ganapathy, V. Structure, function, and expression pattern of a novel sodium-coupled citrate transporter (NaCT) cloned from mammalian brain. **J Biol Chem.**, 277(42):39469-76, 2002.

Kahn, B. B & Flier, J. S. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest.**, 106(4), p. 473-81, 2000.

Kahn, B.B.; Alquier, T.; Carling, D.; Hardie, D.G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab.**, 1(1):15-25, 2005.

Kershaw, E. F. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab.**, 89(6), p. 2548-56, 2004.

Kim, M.S. & Lee, K.U. Role of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase

in the regulation of food intake and energy homeostasis. **J Mol Med.**, 83(7), p. 514-20, 2005.

Laurent, D.; Petersen, K. F.; Russell, R. R.; Cline, G. W.; Shulman, G. I. Effect of epinephrine on muscle glycogenolysis and insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in humans. **Am J Physiol.**, 274 (Pt1), p. E130-8, 1998.

Lieskovska, J.; Ling, Y.; Badley-Clarke, J.; Clemmons, D. R. The role of Src kinase in insulin-like growth factor-dependent mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem.**, 281(35), p. 25041-53, 2006.

Loftus, T. M.; Jaworsky, D. E.; Frehywot, G. L.; Townsend, C. A.; Ronnett, G. V.; Lane, M.D.; Kuhajda, F. P. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. **Science**, 288(5475), p. 2299-300, 2000.

Long, Y.C. & Zierath, J. R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. **J Clin Invest.**, 116(7), p. 1776-83, 2006.

Martin, T.L.; Alquier, T.; Asakura, K.; Furukawa, N.; Preitner, F.; Kahn, B. B. Diet-induced obesity alters AMP-kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. **J Biol Chem.**, 2006.

Mattsson, C.; Rask, E.; Carlstrom, K.; Andersson J.; Eliasson, M.; Ahrén, B.; Olsson, T. Gender-specific links between hepatic 11 beta reduction of cortisone and adipokines. **Obesity**, 15(4), p. 887-94, 2007.

Mayer, J. Glucostatic mechanism of regulation of food intake. **N Engl J Med.**, 249(1):13-6, 1953.

Mayer, J. Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. **Ann N Y Acad Sci.**, 63(1):15-43, 1955.

Mercer, J.G.; Speakman, J. R. Hypothalamic neuropeptide mechanisms for regulating energy balance: from rodent models to human obesity. **Neurosci Biobehav Rev.**,25:101–16. 2001.

Mercer, J. G. & Speakman, J. R. Hypothalamic neuropeptides mechanisms for regulating energy balance: from redent models to human obesity. **Neurosci Biobehav Rev.**, 25(2). P. 101-16, 2001.

McCrimmon, R. J.; Song, Z.; Cheng, H., McNay, E. C.; Weikart-Yeckel, C., Fan, X.; Routh, V. H.; Sherwin, R. S. Corticotrophin-releasing factor receptors within the ventromedial hypothalamus regulate hypoglycemia-induced hormonal counterregulation. **J Clin Invest.**,116(6), p. 1723-30, 2006.

Minokoshi, Y.; Okano, Y.; Shimazu, T. Regulatory mechanism of the ventromedial hypothalamus in enhancing glucose uptake in skeletal muscles. **Brain Res.**, 649(1-2), p. 343-7, 1994.

Minokoshi, Y.; Haque, M. S.; Shimazu, T. Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats.**Diabetes**, 48(2):287-91,1999.

Minokoshi, Y.; Kim, Y. B., Peroni, O.D.; Fryer, L. G.; Muller, C.; Carling, D.; Kahn, B. B. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature.**, 415(6869):339-43, 2002.

Minokoshi, Y.; Alquier, T.; Furukawa, N.; Kim, Y. B.; Lee, A.; Xue, B.; Mu, J.; Fofelle, F.; Ferre, P.; Birnbaum, M. J.; Stuck, B. J.; Kahn, B. B. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature**, 428(6982):569-74, 2004.

Miyoshi, H.; Perfield, J. W.; Souza, S. C.; Shen, W. J.; Zhang, H. H.; Stancheva, Z. S.; Kraemer, F.B.; Obin, M. S.; Greenberg, A. S. Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. **J Biol Chem.**, 282(2), p. 996-1002, 2007.

Moller, D. E. Potencial role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends Endocrinol Metab.**, 11(6), p. 212-7, 2000.

Morgan, K.; Obici, S.; Rossetti, L. Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated. **J. Biol Chem.**, 279(30):31139-48, 2004.

Morris, A. J. & Malbon, C. C. Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling **Physiol Rev.**, 79: 1373-1430, 1999.

Nakashima, K.; Narazaki.; Taga, T. Leptin receptor (OB-R) oligomerizes with itself but not with its closely citokines signal transducer gp 130. **FEBS lett**, 403(1), p. 79-83, 1997.

Namkoong, C.; Ki, M.S.; Jang, P.G.; Han, S. M.; Park, H. S.; Koh, E. H.; Lee, W. J.; Kim, J. Y.; Park, I. S.; Park, J. Y.; Lee, K. U. Enhanced hypothalamic AMP-activated protein kinase activity contributes to hyperphagia in diabetic rats. **Diabetes** 54(1):63-8, 2005.

Nguyen, S & Hsu, C. Y. Excess weight as a risk factor for kidney failure. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, 144(12), p. 5172-8, 2003.

Niswender, K. D.; Schwartz, M. W. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. **Front Neuroendocrinol.**, 24(1), p. 1-10, 2003.

Obici, S.; Feng, Z.; Morgan, K.; Stein, D.; Karkanas, G.; Rossetti, L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. **Diabetes.**, 51(2):271-5, 2002.

Obici, S.; Zhang, B. B.; Karkanas, G.; Rossetti, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. **Nat Med.**, p. 1376-82, 2002.

Obici, S.; Feng, Z.; Arduini, A.; Conti, R.; Rossetti, L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. **Nat Med.**, 9, 756-761, 2003.

Ollmann, M.M.; Wilsom, B. D.; Yang, Y K.; Kerns, J. A.; Barsh, G S. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. **Science**, 281 (5383), p. 1615, 1998.

Orio, F.; Palomba, S.; Cascella, T.; savastano, S., lombardi, G.; Colao, A. cardiovascular complications of obesity in adolescents. **J Endocrinol Invest.**, 30, p. 70-80, 2007.

Paxinos, G.; Watson C.R.; Emson, P.C. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. **J. Neurosci. Meth.**, 3(2), p. 129-149, 1980.

Pimenta, W. P.; Saad, M. J.; Paccola.; G. M.; Piccinato, C. E.; Foss, M. C. Effect of oral glucose on peripheral muscle fuel metabolism in fasted men. **Braz J Med Biol Res.**, 22(4), p. 465-746, 1989.

Pocai, A., Lam, T. K.; Obici, S.; Gutierrez-Juarez, R.; Muse, E. D.; Arduini, A., Rossetti, L. Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats. **J Clin Invest**, 116(4), p. 1081-91, 2006.

Prada, P. O.; Zecchin, H. G.; Gasparetti, A. L.; Torsoni, M. A.; Ueno, M.; Hirata, A. E.; Corezola do Amaral, M. E.; Hoer, N. F.; Boschero, A. C.; Saad MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**. 146(3):1576-87, 2005.

Prada, O.P.; Okamoto, M. M.; Furukawa, L. N.; Machado, U. F.; Heimann, J.; Dolnikoff, M. S. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. **Hypertension**.,35, p. 424-429, 2000.

Rapoport, S. I. In vivo labeling of brain phospholipids by long-chain fatty acids: relation to turnover and function. **Lipids**., 31(Suppl.), p. S97–101, 1996.

Reddy, K. S.; Naik, N.; Prabhakaran, D. Hypertension in the developing world: a consequence of progress. **Curr cardiol Rep**., 8(6), p. 399-404, 2006.

Ribes, G.; Hillaire-Buys, D.; Gross, R.; Blayac, J. P.; Loubatieres-Mariani, M.M. Involvement of a central nervous pathway in yohimbine-induced insulin secretion. **Eur J Pharmacol.**, 162:207–214, 1989.

Rinaman, L.; Verbalis, J. G.; Stricker, E. M, Hoffman, G. E. Distribution and neurochemical phenotypes of caudal medullary neurons activated to express c-Fos following peripheral administration of cholecystokinin. **J. Comp. Neurol.**, 338: 475–90, 1993.

Roman, E. A.; Cesquini, M.; Stoppa, G. R.; Carvalheira, J. B.; Torsoni, M. A.; Velloso, L. A. Activation of AMPK in rat hypothalamus participates in cold-induced resistance to nutrient-dependent anorexigenic signals. **J Physiol.**, 568(Pt 3):993-1001, 2005.

Rossetti, L.; Stenbit, A. E.; Chen, W.; Hu, M.; Barzilai, N.; Katz, E. B. & Charron, M. J. Peripheral but not hepatic insulin resistance in mice with one disrupted allele of the glucose transporter type 4 (GLUT4) gene. **J. Clin. Invest.**, 100, p. 1831-1839, 1997.

Ruderman, N. & Prentki, M. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. **Nat Rev Drug Discov.**, 3(4):340-51, 2004.

Rudolph, M. J.; Amodeo, G. A.; Iram, S.H.; Hong, S. P.; Pirino, G.; Carlson, M.; Tong, L. Structure of the Bateman2 domain of yeast Snf4: dimeric association and relevance for AMP binding. **Structure**, 15(1), p. 65-74, 2007.

Rutter, G.A.; Da Silva Xavier, G.; Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. **Biochem J.**, 1375:1-16, 2003.

Saha, A. K. & Ruderman, N. B. Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership. **Mol Cell Biochem.**, 253(1-2):65-70, 2003.

Salt, I.; Celler, J. W.; Hawley, S. A.; Prescott, A.; Woods, A.; Carling, D.; Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. **Biochem J**, 334, p. 177-87, 1998.

Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, 414(6865), p. 799-806, 2001.

Scheurink, A. J. & Steffens, A. B. Central and peripheral control of sympathoadrenal activity and energy metabolism in rats. **Physiol Behav.**, 48(6):909-20, 1990.

Schwartz, M. W.; Woods, S. C.; Porte, Jr, D.; Seeley, R. J. & Baskin, D.G.

Central nervous system control of food intake. **Nature**, 404, p. 661-71, 2000.

Song, Z.; Levin, B. E.; McArdle, J. J.; Bakhos, N.; Routh, V. H. Convergence of pre-and-postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. **Diabetes**, 50(12), p. 2673-81, 2001.

Spiegelman, B. M.; Puigserver, P.; Wu, Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARgamma and PGC-1. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, Suppl 4, p. S8-10, 2000.

Spiegelman, B. M. & Flier J. S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, 104(4), p. 531-43, 2001.

Steffens, A. B.; Flik, G.; Kuipers, F.; Lotter, E. C.; Luiten, P. G. Hypothalamically-induced insulin release and its potentiation during oral and intravenous glucose loads. **Brain Res.**, 301:351–361, 1984.

Stralfors, P.; Bjorgell, P.; Belfrage, P. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. **Proc Natl Acad Sci.**, 81(11), p. 3317-21, 1984.

Sullivan, J. E, Brocklehurst, K. J.; Marley, A. E.; F.; Carling, D.; Beri, R. K. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. **FEBS Lett.**, 353(1), p. 33-6, 1994.

Takahashi, N.; Patel, H. R.; Qi, Y.; Dushay, J.; Ahima, R. S. Divergent effects of leptin in mice susceptible or resistant to obesity. **Horm Metab Res.**, 34(11-12), p. 691-7, 2002.



Tao, J.; Malbon, C. C.; Wang, H. Y. Galphai2 enhances insulin signaling via suppression of protein-tyrosine phosphatase 1B. **J Biol Chem.**, 276(43):39705-12, 2001.

Trinder, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J Clin Pathol.**, 2, p. 158-61, 1969.

Van Schothorst, E. M.; Franssen-Van, Hal N.; Schaap, MM.; Pennings, J.; Hoebee, B.; Keijer, J. Adipose gene expression patterns of weight gain suggest counteracting steroid hormone synthesis. **Obes Res.**, 13(6), p. 1031-41, 2005.

Velloso, L. A.; Folli, F.; Sun, X. J.; White, M. F.; Saad, M. J.; Kahn, C. R. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 93, p. 2490-2495, 1996.

Verhoeven, A. J.; Woods, A.; Brennan, C. H.; Hawley, S. A.; Hardie, D. G., Scott, J, Beri, R. K, Carling, D. The AMP-activated protein kinase gene is highly expressed in rat skeletal muscle. Alternative splicing and tissue distribution of the mRNA. **Eur J Biochem.**, 228(2):236-43, 1995.

Watson, R. T. & Pessin, J. E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. **Recent Prog Horm Res.**, 56, p. 175-93, 2001.

Willoughby, J., Craig, F. E.; Harvey, S. A.; Clark, J. B. 2-Oxoglutarate: oxidation and role as a potential precursor of cytosolic acetyl-CoA for the synthesis of acetylcholine in rat brain synaptosomes. **J Neurochem.**, 52(3), p. 896-901, 1989.

Wilding JP. Neuropeptides and appetite control. **Diabet Med.**, 19(8), p. 619-27, 2002.

Witters LA, Nordlund AC, Marshall L. regulation of intracellular acetyl-CoA carboxylase by ATP depletors mimics the action of the 5-AMP activated protein kinase. **Biochem Biophys Res Commun.**, p.1486-92, 1991.

Xue B & Kahn BB. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. **J Physiol.**, 574(Pt 1), p. 73-83, 2006.

Yang, C.; Coker, K. J.; Kim, J. K.; Mora, S.; Thurmond, D. C.; Davis, A. C.; Yang, B.; Williamson, R. A.; Shulman, G. I. & Pessin, J. E. Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance **J. Clin. Invest.**, 107, p. 1311-1318, 2001.

Yamaguchi, S.; Katahira, H.; Ozawa, S.; Nakamichi, Y.; Tanaka, T.; Shimoyama, T.; Takahashi, K.; Yoshimoto, K.; Imaizumi, M. O.; Nagamatsu, S.; Ishida, H. Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, 289(4), p. 643-9, 2005.

Yu, M.; Stepto, N. K.; Chibalin, A. V.; Fryer, L. G.; Carling, D.; Krook, A.; Hawley, J.A, Zierath, J. R. Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling. **J Physiol.**, 546, p. 327-35, 2003.