# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

# MARISTELA CESQUINI OLIVEIRA

# Efeito do citrato sobre a AMPK hipotalâmica e o controle da fome e a homeostase da glicose

F	ste exemplar corresponde à redação final
	la tese defendida pelo(a) candidato (a)
5	Maristela gozuni Correcto
	Ataw X.
-	e aprovada pela Comissão Julgadora.
1	

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

Orientador: Prof. Dr. Licio Augusto Velloso Co-Orientador: Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni

Campinas, 2006

i

UNIDADE BC Nº CHAMADA TI UNICAMP OL42
TOMBO BC/ 70966
PROC. 16. P.00123.06
PREÇO 11.00
DATA 19/12/06
BIB-ID 394919

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP



Título em inglês: Effect of citrate on the hypothalamic AMPK, food intake and glucose homeostase.

Palavras-chave em inglês: Citrate; Hypothalamus; AMP-activated protein kinase; Hunger; Blood sugar.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Lício Augusto Velloso, Hiroshi Aoyama, Fernanda Ramos Gadelha, Patrícia da Silva Melo, Eliana Pereira de Araújo.

Data da defesa: 30/08/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Data da Defesa: 30 de agosto de 2006

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Márcio Alberto Torsoni (Co-Orientador)

Prof.Dr. Hiroshi Aoyama

aw Assinatura

Assinatura

Profa.Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Prof.Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Profa.Dra. Eliane Beraldi Ribeiro

Profa.Dra. Patrícia da Silva Melo

Profa.Dra. Eliana Pereira de Araújo

Profa.Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

adella. Assinatura

Assinatura

Eliane

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

#### **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni pela orientação, apoio, 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 Dr. Hiroshi Aoyama, Dra. Fernanda Ramos Gadelha, Dr. José Barreto Campelo Carvalheira, Dra. Eliane Beraldi Ribeiro, Dra. Eliana Pereira de Araújo, Dra.Patrícia Melo da Silva e Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch, 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.

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

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

A todos os amigos e colegas do laboratório pelos momentos de descontração e pelas discussões científicas.

À Patrícia Prada pela ajuda nos experimentos de clamp.

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

À Ellen pela ajuda nas fotos do RT-PCR.

As alunas de iniciação científica Vanessa, Viviane e Karina pelas colaborações nos experimentos.

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

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

À Graziela, minha grande amiga, pela fundamental colaboração neste trabalho, pelas discussões sempre bem humoradas e, principalmente, por cada dia de feliz convivência.

Aos meus pais e avô pelo amor, incentivo e pelo apoio que me deram durante todos estes anos.

Aos meus irmãos Renato e Leonardo pelo companheirismo e incentivo e ao Renato, pela ajuda nas dúvidas de química.

Ao meu marido Paulo pelo amor, ajuda e paciência que foram fundamentais durante toda a execução deste trabalho.

A Deus por ter tanta coisa a agradecer.

# <u>Índice</u>

1- Introdução		
2- Justificativas e Objetivos		
3- Materiais e Métodos	19	
3.1) Animais Experimentais	19	
3.2) Cirurgia Extereotáxica	19	
3.3) Infusão Intracerebroventricular	20	
3.4) Protocolo para Tratamento com Drogas	20	
3.5) Avaliação da Ingestão Alimentar e Peso Corpóreo	21	
3.6) Medidas Bioquímicas e Hormonais	22	
3.7) Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (ipGTT)	23	
3.8) Clamp Hiperinsulinêmico-Euglicêmico	23	
3.9) Extração de Tecidos	24	
3.10) Imunoprecipitação e Imunoblot	25	
3.11) Análise por RT-PCR	26	
3.12) Análises Estatísticas	29	
4- Resultados	30	
4.1) Efeito do Citrato na Ativação da AMPK e ACC Hipotalâmicas	30	
4.2) Efeito do Citrato e ARA-A na Ingestão Alimentar e Fosforilação da ACC Hipotalâmica	32	
<ul> <li>4.3) Efeito do Citrato na Ingestão Alimentar e Ativação da AMPK</li> <li>Hipotalâmica de Ratos Mantidos em Jejum</li> </ul>	34	
4.4) Efeito do Citrato no Ganho de Peso Corpóreo	36	
4.5) Efeito do Citrato na Expressão de Neuropeptídeos hipotalâmicos	36	
4.6) Efeito do Citrato na Captação de Glicose	37	

4.7) Avaliação da Produção de Glicose Hepática	41	
4.8) Determinação dos Níveis Séricos de Insulina e Corticosterona	43	
4.9) Efeito do Citrato na Expressão das Enzimas Gliconeogênicas	45	
4.10) Efeito do Citrato Ativação da AMPK e ACC Hepáticas	47	
4.11) Avaliação da Transdução do Sinal da Insulina no Fígado após Tratamento com Citrato		
4.12) Efeito do Citrato na Transdução do Sinal da Insulina no Tecido Adiposo e Músculo Esquelético	55	
4.13) Efeito da Inibição β Adrenérgica na Transdução do Sinal da Insulina Induzida pelo Citrato no Fígado		
5) Discussão	60	
6) Conclusão		
7) Referências Bibliográficas		

### Lista de Abreviaturas

ACC	Acetil-CoA Carboxilase
AgRP	Proteína relacionada ao gene agouti
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	AMPcíclico
АМРК	Proteína quinase ativada por AMP
АМРКК	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
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
G6Pase	Glicose 6 fosfatase
GLUT	Transportador de glicose
GSK3	Glicogênio sintase quinase 3
ICV	Intracerebroventricular
IL-6	Interleucina 6

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
mTOR	"Mammalian target of rapamycin"
NPY	Neuropeptídeo Y
ObR	Receptor da leptina
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxiquinase
PGC-1	Co-ativador do receptor gama ativado por proliferador de
	peroxissomo 1
РІЗК	Fosfatidilinositol-3-quinase
РКВ	Serina/treonina proteína quinase B
POMC	Propiomelanocortina
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
ТМ	Temperatura de Fusão
TNF α	Fator de necrose tumoral $\boldsymbol{\alpha}$
TORC	Transdutor da atividade de CREB regulada
VMH	Hipotálamo ventromedial

#### <u>Resumo</u>

O aumento da prevalência da obesidade e diabete tipo 2 nas sociedades modernas está fortemente associado às doenças cardiovasculares, hipertensão, infarto e aterosclerose. Estas patologias têm sido relacionadas com ingestão calórica excessiva e diminuição do gasto energético. Muitos fatores regulam a ingestão alimentar, incluindo hormônios como insulina e leptina, alimentos e comportamento. Estes fatores são integrados no hipotálamo que media um sistema de sinalização celular para regular o comportamento alimentar e o balanço energético da célula. A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) tem sido proposta como capaz de mediar as adaptações celulares às variações nutricionais ambientais. O resultado da ativação da AMPK é a inibição de vias biossintetizantes que consomem energia, tais como as vias de síntese de ácidos graxos e proteínas, e a ativação de vias catabólicas, como a via de oxidação de ácidos graxos e a glicólise. No hipotálamo, a AMPK desempenha o papel de mediar os efeitos hormonais na ingestão alimentar e no balanço energético. Outras moléculas, como a acetil-CoA carboxilase (ACC) e o seu produto, o malonil-CoA têm sido propostas como possíveis intermediários na sinalização hipotalâmica que monitora o estado energético do corpo. No presente trabalho, nós administramos citrato, um ativador alostérico da ACC, no hipotálamo de ratos a fim de investigarmos o efeito deste composto na atividade hipotalâmica e hepática da AMPK. O resultado desta modulação no metabolismo energético, metabolismo de glicose e comportamento alimentar foi comparado aos ratos tratados com salina. Nós observamos que o tratamento com citrato inibiu a fosforilação da AMPK hipotalâmica seguido de inibição da fosforilação da ACC hipotalâmica, indicando menor atividade da AMPK neste tecido. A inibição da AMPK promoveu diminuição da ingestão alimentar, perda de peso corpóreo e aumento da expressão dos neuropeptídeos anorexigênicos

POMC e CRH. No grupo de ratos tratados com citrato, a captação de glicose foi maior do que nos ratos que receberam solução salina, como mostrada pelo teste tolerância à glicose (GTT) e pelo clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico. Consistente com estes resultados, no fígado, os ratos tratados com citrato mostraram maior fosforilação das proteínas da cascata de sinalização da insulina, reduzidos níveis de fosforilação da AMPK e ACC e expressão aumentada da PEPCK e G6Pase, se comparado aos animais controle. O efeito central do citrato na melhora da sinalização da insulina nos tecidos periféricos, na ativação da produção de glicose pelo fígado e na inibição da AMPK hepática foi bloqueado por antagonista  $\beta$ -adrenérgico. De acordo com estes resultados, nós podemos sugerir que a modulação da AMPK por intermediários metabólicos possa ser um mecanismo importante de controle da homeostase energética е consequentemente do diabetes e obesidade.

#### Abstract

The increased prevalence of obesity and type II diabetes in modern societies is largely linked to cardiovascular disease, hypertension, stroke and atherosclerosis. These pathologies have been associated to excessive caloric intake and decreased energy expenditure. Many factors regulate food intake, including hormones such as insulin and leptin, fuels and behavior. These factors are integrated in the hypothalamus that mediates a signaling system to regulate food behavior and cellular energy balance. The AMPactivated protein guinase (AMPK) has been proposed to be capable of mediating the cellular adaptations to nutritional environmental variation. The result of AMPK activation is the inhibition of energy-consuming biosynthetic pathways, such as fatty acid and protein synthesis, and activation of ATP-catabolic pathways, such as fatty acid oxidation and glycolysis. In the hypothalamus, AMPK mediates hormonal effects on food intake and energy balance. Other molecules, such as acetyl-CoA carboxylase (ACC) and its product malonyl-CoA have been proposed as possible intermediaries in the hypothalamic signaling pathway that monitors energy status. In the present work we administrated citrate, an allosteric activator of ACC, in the hypothalamus to investigate its effect on hypothalamic and hepatic AMPK activity and the result of this modulation in the energetic cellular metabolism, such as glucose metabolism and food behavior. Results were compared to saline-treated rats. Here we show that citrate treatment inhibited hypothalamic AMPK phosphorylation followed by an inhibition of hypothalamic ACC phosphorylation, indicating lower AMPK activity in this tissue. The AMPK inhibition promoted decrease in food intake, loss of body weight and increased expression of anorexigenic neuropeptides (POMC and CRH). In the citrate group, the glucose uptake was higher than in animals receiving saline according to GTT and hyperinsulinemic-euglycemic clamp. Consistent with these results, in the liver, citrate-treated rats showed also higher phosphorylation of insulin signaling

proteins than control rats, reduced AMPK and ACC phosphorylation and increased PEPCK and G6Pase expression. Supported by these results, we suggest that AMPK modulation by citrate can be an important mechanism to understand deregulated glucose metabolism involved in diabetes and obesity. The central effect of citrate in the improvement of peripheral insulin signaling, in the activation of liver glucose production, and in the inhibition of hepatic AMPK was blocked by the β-adrenergic antagonist. According to these results, we suggest that AMPK modulation by metabolic intermediaries can be an important mechanism controlling the energetic homeostase, diabetes and obesity.

#### Introdução

Nos últimos anos as alterações metabólicas presentes na obesidade e no diabetes, têm sido amplamente investigadas. O aumento da prevalência destas desordens é associado a fatores presentes na sociedade moderna, como a facilidade na aquisição de nutrientes e diminuição de atividades físicas (Friedman, 2003).

A obesidade é uma desordem causada por um desequilíbrio energético onde a ingestão alimentar excede o gasto calórico (Flier, 2004). Nos últimos 10 anos, várias investigações têm sido realizadas para se entender as causas da obesidade e hoje, acredita-se que a presença dos sinais de obesidade tenha um papel fundamental na origem desta doença (Broberger, 2005). Estes sinais são produzidos em proporção ao nível de tecido adiposo do organismo e atuam no sistema nervoso central, principalmente no hipotálamo, indicando saciedade e inibindo a ingestão alimentar. A leptina e a insulina são hormônios produzidos pelo tecido adiposo e pelas células do pâncreas, respectivamente, e preenchem os critérios para as moléculas classificadas como sinais de obesidade (Niswender & Schwartz, 2003).

A leptina e a insulina circulam pela corrente sanguínea até o cérebro e ativam neuropeptídeos hipotalâmicos responsáveis pela diminuição da fome. Por outro lado, níveis reduzidos destes hormônios resultam em hiperfagia e obesidade. Alterações genéticas, como aquelas em que há um problema nos receptores de leptina, também podem levar à perda do controle da ingestão alimentar e à obesidade (Farooqi et al., 2001).

A obesidade está associada a várias patologias como aumento de gordura em tecidos magros que pode levar à lipotoxicidade, cardiomiopatia, aterosclerose, falência

renal, infarto, diabetes *mellitus* não dependente de insulina e resistência à insulina (Unger, 2003).

A insulina é produzida pelas células  $\beta$  do pâncreas logo após a alimentação a fim de normalizar os níveis de glicose sanguínea. A insulina circulante rapidamente atinge os seus órgãos alvos, principalmente fígado, músculo e tecido adiposo onde ela interage com seus receptores (Gual et al., 2005). O receptor de insulina (IR) pertence à família dos receptores localizados na superfície da célula e que possuem atividade tirosina quinase intrínseca.

O IR é composto de duas subunidades extracelulares ( $\alpha$ ) e duas subunidades transmembranas ( $\beta$ ) ligadas por pontes dissulfeto. A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  induz à autofosforilação em tirosina da subunidade  $\beta$ . O IR ativado, subsequentemente, fosforila os seus substratos incluindo o IRS 1 a 4 (proteína substrato para o receptor de insulina 1 a 4), Shc (Src homoloy collagen) e APS (proteína adaptadora com um domínio PH e SH2). Estas proteínas fosforiladas funcionam como moléculas efetoras capazes de ativar diferentes vias de sinalização celular como a via da PI3Kinase (fosfatidilinositol 3 quinase). A via da PI3Kinase, através da ativação pelo IRS1, está preferencialmente envolvida em ações metabólicas da insulina tais como captação de glicose e síntese de lipídios e glicogênio (Saltiel & Kahn, 2001).

A PI3Kinase catalisa a fosforilação de fosfoinositídeos na posição 3 para produzir fosfatidilinositol-3-fosfato, especialmente o PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub>, que se liga ao domínio PH de uma variedade de moléculas sinalizadoras alterando assim suas atividades ou suas localizações celulares (Lietzke et al., 2000). Entre as moléculas ligadoras de PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub>, está a serina/treonina proteína quinase B (PKB ou Akt) que possui um domínio PH que interage com PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> promovendo a sua translocação para a membrana plasmática e sua subseqüente ativação catalítica (Sheid et al., 2001). Uma vez ativada, a

Akt promove uma série de eventos fisiológicos como, a estimulação da captação de glicose pelo músculo esquelético e adipócitos via a translocação de transportadores de glicose (GLUT 4) para a membrana plasmática, estimulação da síntese de glicogênio hepático via a fosforilação e inativação da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), controle da atividade mitogênica celular por ativação da via da ERK (Walker et al.,1998) e regulação positiva da síntese proteica por ativação de mTOR ("mammalian target of rapamycin"). O mecanismo pelo qual a Akt ativa a mTOR é pouco entendido, mas acredita-se que seja via foforilação e inibição de um complexo regulador negativo da mTOR chamado TSC2 (Hahn-Windgassen, et al.,2005).

Além disso, a Pl3Kinase possui também atividade serina quinase e pode interagir com outras moléculas sinalizadoras independentes da formação do PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> (Kessler et al.,2001).

Além de sua atuação periférica, a insulina também atua no hipotálamo e desencadeia um sinal de saciedade através da indução da expressão de neuropeptídeos anorexigênicos e inibição da expressão dos neuropeptídeos orexigênicos, diminuindo desta maneira, a ingestão alimentar (Schwartz et al, 1992).

Quando o efeito desencadeado pela insulina no tecido não resulta em resposta normal, um quadro de resistência à insulina pode se instalar levando ao diabetes *mellitus*.

O diabetes *mellitus* é um problema de saúde pública de grande prevalência no mundo (Zimmet et al, 2001). Ele é caracterizado pelos níveis elevados de glicose no sangue (hiperglicemia), ácidos graxos e, em casos severos, corpos cetônicos (Cerasi, 1992). A doença é associada à ausência de insulina causada pela destruição autoimune das células  $\beta$  do pâncreas (diabetes tipo I ou insulina dependente), ou é associada a níveis baixos, normais ou altos deste hormônio em resposta à resistência à insulina ou a

função prejudicada das células β do pâncreas (diabetes tipo II ou não dependente de insulina) (Satiel & Kahn, 2001).

A resistência à insulina é encontrada em tecidos alvos deste hormônio como músculo, adipócitos e fígado e pode ser causada pela ação ineficiente da insulina ou ainda por um defeito no receptor da insulina (IR) (Taylor, 1992). A obesidade também pode ser responsável pela resistência à insulina e consequentemente pelo diabetes tipo II (Kim et al., 2001). A captação de glicose pelo músculo e demais tecidos estimulada por insulina se dá via uma cascata de reações que envolvem a fosforilação do IR, dos substratos do IR (IRS<sub>1</sub> e IRS<sub>2</sub>), de uma proteína Pl3Kinase e a translocação para a membrana plasmática de transportadores de glicose dependentes de Pl3Kinase (esquema 01).



Esquema 01: Sinalização da Insulina

Experimentos demonstraram que dietas ricas em gordura atrapalham a ativação da via Pl3kinase pela insulina (Shulman, 2000). Como as dietas que induzem obesidade geralmente são dietas ricas em gordura, o mecanismo via Pl3K parece ser uma das explicações para a ligação da obesidade e resistência à insulina (Niswender & Schwartz, 2003).

A teoria de que a resistência à insulina poderia ser resultado de um aumento nos níveis de ácidos graxos livres circulantes foi inicialmente proposta por Randle et al em 1963. Desde então, vários estudos têm relacionado as causas do diabetes *mellitus* II com o aumento nos níveis plasmáticos de lipídios. Mais recentemente, os trabalhos de Shulman (2000) e Ruderman (2006) mostraram que o aumento dos níveis de ácidos graxos livres, durante o clamp euglicêmico, causou resistência à insulina em músculos esqueléticos de humanos, acompanhada de aumento considerável nas concentrações de diacilglicerol (DAG) medidas nestes indivíduos. Além disso, Ruderman (2006) mostrou que este aumento nos ácidos graxos livres provocou a ativação da proteína serina quinase PKC, responsável pela fosforilação em serina do substrato para o receptor de insulina (IRS1).

A fosforilação em serina do IRS1 é um evento importante na desensibilização da ação da insulina e no desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo II (Sesti et al., 2001). Sabe-se também, que o aumento de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), endotelina 1, IL-6 (interleucina 6) e ácidos graxos livres observados nos quadros de obesidade, induzem resistência à insulina por promoverem ativação de serina quinases que fosforilam elementos da cascata de sinalização da insulina, atrapalhando suas funções e inibindo a propagação do sinal deste hormônio (Foli et al., 2003). Dessa forma, a fosforilação em serina do IRS1 e de outras proteínas, poderia representar outro mecanismo de ligação entre o diabetes tipo II e a obesidade.

A obesidade pode também estar relacionada à deficiência de leptina. A leptina, membro da família das citocinas é um hormônio secretado como produto do gene ob, principalmente pelo tecido adiposo branco, embora outros tecidos como a placenta, músculo e epitélio gástrico possam produzi-la em baixas concentrações (Ahima & Osei, 2004). A leptina é liberada na corrente sanguínea e se liga ao seu receptor (ObR) no órgão alvo. Vários órgãos e tecidos possuem receptores para a leptina, como o fígado, músculos, rins, pulmões e hipotálamo. 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). Entres 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 e induz a expressão gênica (White et al., 1997).

No hipotálamo, a ligação da leptina no seu receptor age como um sinal de disponibilidade de nutrientes, regulando a captação e o gasto energético (Lin et al., 2000). Na periferia, a leptina estimula a oxidação de ácidos graxos, captação de glicose e previne o acúmulo de lipídios em tecidos não adipogênicos, contribuindo para a prevenção da lipotoxicidade (Minokoshi et al.,2002). A deficiência deste hormônio está relacionada ao aumento da ingestão alimentar e supressão de gasto energético, podendo levar a um quadro de obesidade (Flier, 2004).

Assim, alterações no delicado balanço energético do organismo podem causar o desarranjo da homeostase energética e contribuir para o desenvolvimento da obesidade e do diabetes.

O balanço energético é monitorado pelo sistema nervoso central, principalmente o hipotálamo, que regula a magnitude da ingestão alimentar e o gasto calórico, além de

controlar a ingestão de água, termogênese, ciclo sono e vigília, padrões de comportamento sexual e metabolismo do corpo (Uyama et al., 2004).

O hipotálamo é dividido em áreas e núcleos (arqueado, lateral, medial e periventricular) que possuem funções definidas. A área lateral (LHA) está envolvida com a sinalização parassimpática e a estimulação desta área leva a diminuição do apetite e a uma série de respostas anabólicas (Yoshimatsu et al., 1984). A área medial, que é constituída em grande parte pelo núcleo ventromedial (VMH), está relacionada à sinalização simpática e a estimulação deste núcleo produz aumento do apetite e ativação de respostas catabólicas (Yoshimatsu et al., 1984). Assim, as funções da LHA e do VMH são recíprocas. A área periventricular, que possui o núcleo periventricular (PVN), é uma área chave do hipotálamo, pois recebe sinais de outras áreas hipotalâmicas. No núcleo PVN existem dois grupos de células, o primeiro grupo controla o sistema nervoso autonômico e regula o fluxo de inervação simpática e parassimpática para órgãos viscerais, como fígado, pâncreas e glândula adrenal (van Dijk et al., 1994), o outro grupo de células é constituído por neurônios neurosecretórios, que afetam a glândula pituitária e controlam a secreção de vários hormônios (Freund-Mercier et al., 1981).

O controle da ingestão alimentar feito pelas áreas hipotalâmicas é possível pela presença, nestas áreas, de neurônios que produzem neuropeptídeos anorexigênicos (inibem a ingestão alimentar) e orexigênicos (estimulam a ingestão alimentar). Dentre os neurônios anorexigênicos, estão aqueles que produzem os neuropeptídeos POMC (proopiomelanocortina) e CART (transcrito regulado por cocaína e anfetamina) e dentre os orexigênicos, estão aqueles que produzem o NPY (neuropeptídeo Y) e AgRP (proteína relacionada ao agouti). Estes neurônios se localizam no núcleo arqueado do hipotálamo e são classificados como neurônios de primeira ordem por estarem em contato direto com a leptina e a insulina, e se projetarem para outros grupos de neurônios (segunda ordem) a

fim de estabelecerem a comunicação das áreas hipotalâmicas e integrarem os sinais relacionados à ingestão alimentar (Schwartz et al, 2000).

A insulina e a leptina são os principais sinais hipotalâmicos que regulam a homeostase energética e a adiposidade do corpo. No hipotálamo, a insulina e a leptina agem nos neurônios POMC ativando a secreção do neuropeptídeo anorexigênico  $\alpha$ -MSH (hormônio estimulador de α melanócito) e nos neurônios NPY/AgRP inibindo a expressão dos neuropeptídeos orexigênicos NPY e AgRP (Obici et al., 2001). O papel destes hormônios no balanço energético tem sido evidenciado em vários trabalhos que demonstram que resistência central à insulina e à leptina pode levar à hiperfagia, aumento das concentrações plasmáticas de insulina e leptina e mudanças no balanço energético e na massa gorda (Porter et al., 2002 e Niswender et al., 2003). É importante salientar que a via de sinalização destes 2 hormônios se comunicam ("cross talk") e, portanto, a ação de um hormônio pode interferir na sinalização do outro. No hipotálamo, a insulina modula a ativação do STAT3 via leptina (Carvalheira et al., 2001). A ligação da leptina no seu receptor (ObR), é capaz de fosforilar IRS e induzir a via de sinalização IRS/PI3K através de ativação de JAK2 (Bates et al., 2003). O trabalho de Carvalheira et al. (2005) reforça estes achados mostrando que em hipotálamo, as ações combinadas da leptina e insulina levam a potencialização de vias de sinalização moleculares ao nível de JAK2 e aumentam a estimulação fisiológica de processos como o controle da ingestão alimentar e do peso corpóreo. Assim, os processos controlados pela ligação entre leptina e insulina no hipotálamo podem contribuir para o entendimento de patologias metabólicas como a obesidade e o diabetes.

Desta forma, neuropeptídeos e sinais hormonais que indicam o status energético da célula são integrados no hipotálamo e são transmitidos para outras regiões do cérebro e do corpo a fim de produzirem as respostas comportamentais adequadas (Cha et al., 2004).

Após receber informações dos nervos aferentes, o hipotálamo manda sinais para órgãos periféricos, como músculo, tecido adiposo, sistema endócrino e fígado, para controlar a homeostase (Uyama et al., 2004). Evidências têm demonstrado que os tecidos periféricos possuem inervação hipotalâmica e que é ela a responsável pela regulação do metabolismo e hemodinâmica destes órgãos (Oben et al., 2003). O fígado possui nervos contendo neurotransmissores (noradrenalina e acetilcolina) e neuropeptídeos (substância P, somatostatina, glucagon, serotonina, neurotensina, galanina e neuropeptídeo Y) que ajudam a regular as funções do fígado (Uyama et al., 2004).

As funções do fígado são muito importantes para o metabolismo do corpo desde que, após serem absorvidos a maioria dos carboidratos, aminoácidos e triacilgliceróis passa para o sangue e é captada pelo fígado. Os hepatócitos transformam os nutrientes obtidos em combustíveis e precursores requeridos em cada tecido e os exportam para o sangue (Knighton et al., 1991).

Em mamíferos, o fígado é o principal responsável pela conversão do excesso de carboidrato da dieta em triacilgliceróis. A glicose pode ser metabolizada no fígado e fornecer substratos como o acetil-CoA, para a síntese de ácidos graxos. O excesso de carboidratos também resulta na ativação de vários genes das enzimas glicolíticas e lipogênicas (Dentin et al., 2005).

A regulação do metabolismo de açúcares e gorduras no fígado é controlada primeiramente pela insulina e glucagon. No estado pós-prandial, o fígado capta aminoácidos, lipídios e carboidratos em resposta a um aumento na insulina e no jejum, um decréscimo na razão plasmática insulina/glucagon leva à degradação do glicogênio hepático, β oxidação e cetogênese (Barthel & Schmoll, 2003). Em patologias, como no

diabetes tipo I, onde os níveis de insulina estão descontrolados, hiperglicemia e cetoacidose são observados como resultado do aumento da  $\beta$  oxidação e cetogênese hepáticas. Por outro lado, no diabetes tipo II, os efeitos anabólicos exagerados pelas altas concentrações de insulina produzem aumento da biossíntese de ácidos graxos e diminuição da  $\beta$  oxidação no fígado (Casteels & Mathieus, 2003).

Em condições de jejum, o glucagon pancreático ativa no fígado programas catabólicos, em parte via CREB (proteína ligadora de elemento responsivo ao AMPc). Após o estímulo pelo glucagon, o AMPc fosforila CREB na Ser133, que se liga a CRE (elementos responsivos ao AMPc) e forma um complexo. Este complexo formado estimula a gliconeogênese hepática e a oxidação de ácidos graxos pela indução da expressão do co-ativador nuclear PGC-1 $\alpha$  (Lin et al., 2004).

Foi demonstrado também que AMPc pode estimular a expressão de genes gliconeogênicos através da sua capacidade de desfosforilar e induzir a entrada nuclear de TORCs, uma família de coativadores citoplasmáticos que aumentam a expressão celular de genes envolvidos na gliconeogênese via interação com CREB (Bittinger et al., 2004). Dentre os membros da família TORC, o TORC 2 parece ser a forma predominante no fígado, e por este motivo tem sido atribuído a ele o papel de indutor do programa de gliconeogênese hepática (Koo et al., 2005). O trabalho de Koo et al. (2005) mostra que a associação de TORC2-CREB estimula a transcrição de genes das enzimas gliconeogênicas PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) e da G6Pase (glicose 6 fosfatase).

As respostas metabólicas do fígado também são mediadas pela leptina. No fígado, foi demonstrado que a leptina, a fim de prevenir acúmulo de gordura em tecidos não lipogênicos, estimula a oxidação hepática de lipídios (Unger, 2003). Associado ao controle hormonal, nervos autonômicos do hipotálamo que inervam o fígado controlam o metabolismo de glicose através da modulação de enzimas hepáticas chaves como a glicogênio fosforilase, PEPCK, piruvato quinase, AMPK (quinase ativada por AMP) e ACC (acetil-CoA carboxilase) (Uyama et al., 2004). Desta forma, alterações hipotalâmicas no nível energético das células, como abundância ou escassez de nutrientes, alteram a ingestão alimentar e também diferentes circuitos para os órgãos periféricos, principalmente o fígado, com o intuito de equilibrar o metabolismo geral do organismo (Obici & Rossetti, 2003). Para que isto seja possível, o sistema nervoso central possui uma rede de sinalização que medeia a ação de nutrientes e o balanço energético (Minokoshi et al., 2004).

Envolvidas nesta rede de sinalização estão proteínas como AMPK (proteína quinase ativada por AMP) e ACC (acetil-CoA carboxilase). A AMPK é um componente de uma cascata de quinases que age como um sensor energético celular, pois é ativada em resposta a fatores de estresse ambiental e nutricional que aumentam os níveis de AMP e depletam os níveis de ATP intracelular, incluindo choque térmico, hipóxia, hipoglicemia e exercício físico prolongado (Carling, 2005). Ela é amplamente expressa em mamíferos, sendo encontrada nos músculos cardíacos e esqueléticos, fígado, tecido adiposo e hipotálamo.

A AMPK é um complexo heterotrimérico formado de uma subunidade catalítica ( $\alpha$ ) e duas subunidades regulatórias ( $\beta \in \gamma$ ) (Kahn et al., 2005). Duas isoformas foram identificadas para as subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_1 \in \alpha_2$ ) e  $\beta$  ( $\beta_1 \in \beta_2$ ) e três isoformas foram reportadas para a subunidade  $\gamma$  ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2 \in \gamma_3$ ) (Hardie et al., 1998).

A subunidade  $\alpha$  contém um domínio quinase N-terminal e um domínio C-terminal envolvidos na formação do complexo protéico. As subunidades  $\beta$  contem domínios C-terminais 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* (Kemp, 2004) e possuem a capacidade de se ligar a uma molécula de AMP ou de ATP de maneira exclusiva, corroborando os achados de Scott et al. (2004) de que altas concentrações de ATP antagonizam a ativação da AMPK por AMP. A ligação das moléculas de AMP ou de ATP aos domínios Bateman acontece com alta cooperatividade positiva, o que poderia ser um mecanismo de adaptação para aumentar a sensibilidade do sistema AMPK a pequenas mudanças nos níveis destes nucleotídeos (Kakn et al., 2005).

O AMP pode promover a ativação da AMPK alostericamente ou estimular a fosforilação do seu domínio quinase no resíduo de treonina 172 (thr 172) por uma quinase ativadora de AMPK (AMPKK). O nucleotídeo pode ainda garantir a fosforilação da AMPK inibindo a ação de fosfatases que poderiam desfosforilar a AMPK (Kakn et al., 2005). A identidade da AMPKK permaneceu obscura por muitos anos, mas recentemente vários trabalhos têm reportado que as quinase LKB1 e a CAMKK (quinase da proteína quinase dependente de Ca<sup>+2</sup>-calmodulina) possuem os requisitos bioquímicos necessários para fosforilar e ativar a AMPK (Hawley et al., 2003; Shaw et al., 2004 e Woods et al., 2004). Além disso, Sakamoto et al. (2005) e Shaw et al. (2005) mostraram, em seus trabalhos, que LKB1 é a principal quinase ativadora de AMPK no músculo esquelético e no fígado, respectivamente. O resultado da ativação da AMPK é a ativação de vias de produção de energia (catabólicas), tais como a oxidação de ácidos graxos e a glicólise e a inibição de vias de consumo de energia (anabólicas), tais como, síntese de ácidos graxos, síntese de colesterol, síntese de proteínas e gliconeogênese hepática (Carling, 2004). O controle da gliconeogênese hepática pode acontecer devido à capacidade da AMPK fosforilar o co-

ativador da expressão de genes gliconeogênicos, TORC2 e assim inibir sua entrada no núcleo e a conseqüente ativação da gliconeogênese (Koo et al., 2005).

Acredita-se que a AMPK hipotalâmica tenha papel na mediação dos efeitos nutricionais e hormonais na ingestão alimentar e no balaço energético (Minokoshi et al., 2004).

Além de estresse nutricional e ambiental, a atividade da AMPK também pode ser influenciada por alterações nos níveis de glicose, leptina, adiponectina, insulina (Minokoshi et al., 2004), resistina, peptídeos orexigênicos e anorexigênicos e drogas antidiabéticas (Brunmair et al., 2004).

As alterações nos níveis de glicose podem indicar o estado energético da célula e funcionar como um modulador da atividade da AMPK. Os resultados de Minokoshi et al. (2004) mostraram que injeção de glicose intraperitoneal em camundongos suprimiu a atividade da AMPK hipotalâmica. A resistina é um hormônio secretado pelos adipócitos que age no fígado atrapalhando a ação da insulina na produção de glicose hepática e dimunindo a ativação da AMPK (Muse et al., 2004). Adiponectina é uma molécula produzida pelo tecido adiposo relacionada com a liporegulação e, em tecidos magros como músculo esquelético e fígado, a leptina e adiponectina aumentam a atividade da AMPK a fim de aumentarem vias catabólicas como oxidação de ácidos graxos e prevenirem o acúmulo exagerado de lipídios nestes tecidos (Minokoshi et al, 2002). Por outro lado, no hipotálamo, junto da leptina e insulina, funcionam diminuindo a atividade da AMPK e a fome (Unger, 2003).

A metformina e as tiazolidinedionas são drogas amplamente utilizadas no tratamento do diabetes tipo 2 e foi encontrado que elas podem ativar indiretamente a AMPK. Ambas as drogas inibem o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial causando diminuição da produção de ATP e aumento da razão AMP/ATP, levando assim à ativação da AMPK

(Fryer et al., 2004). Tiazolidinedionas também aumentam os níveis de adiponectina e diminuem os níveis de resistina o que pode contribuir, indiretamente, para a ativação da AMPK (Kahn et al., 2005).

A regulação da ingestão alimentar pela AMPK e a sua presença no hipotálamo tem despertado bastante interesse. Sua atividade no hipotálamo modulada pelo estado nutricional (o jejum aumenta a atividade da AMPK, enquanto a realimentação diminui sua atividade) (Minokoshi et al., 2004 e Roman et al., 2005) e sua atividade modulada por drogas antidiabéticas na periferia (Brunmair et al., 2004) torna esta proteína um alvo para os tratamentos da obesidade e diabetes.

A atividade catalítica da AMPK está intimamente relacionada com uma outra enzima, a acetil-CoA carboxilase (ACC). A AMPK ativada (fosforilada) é responsável pela fosforilação da ACC (ser 79) e sua inibição (esquema 02).



Esquema 02: Atividade da AMPK

A ACC é uma enzima amplamente expressa em tecidos animais, como hipotálamo, músculos esquelético e cardíaco, fígado, tecido adiposo e glândula mamária (Pan e Hardie, 2002). Sua função é a carboxilação do substrato aceti-CoA produzindo malonil-CoA, que por sua vez participa como o primeiro intermediário na biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa. O malonil-CoA também pode impedir a oxidação de ácidos graxos por inibir a enzima carnitina aciltransferase1 (CPT-1). A CPT-1 está localizada na membrana externa da mitocôndria e auxilia o transporte do ácido graxo para a matriz mitocondrial durante a oxidação lipídica. A inibição da CPT-1 assegura que a oxidação de ácidos graxos seja diminuída sempre que o fígado tenha amplo suprimento de glicose como combustível e esteja fabricando triacilgliceróis a partir desta glicose (Abu-Elheiga et al., 2000).

Duas isoformas da ACC foram identificadas, ACC<sub>a</sub> ou ACC<sub>1</sub> e ACC<sub>β</sub> ou ACC<sub>2</sub>. ACC<sub>a</sub> é encontrada no citoplasma e o malonil-CoA produzido por ela está relacionado com a biossíntese de ácidos graxos, sendo assim encontrada em grandes concentrações em tecidos lipogênicos como tecido adiposo, fígado e glândulas mamárias. A ACC<sub>β</sub> está associada à mitocôndria e co-localizada com CPT-1 e acredita-se que o malonil-coA proveniente da reação catalisada por ela esteja envolvido com a inibição da CPT-1 e consequentemente, com o controle da oxidação dos ácidos graxos principalmente em órgãos como os músculos esquelético e cardíaco (Abu-Elheiga et al., 1997).

Desta forma, o malonil-CoA funciona tanto como intermediário na síntese de ácidos graxos quanto como inibidor da CPT-1, que controla a oxidação de lipídios. Por este motivo, o malonil-CoA tem sido identificado como um sensor bioquímico de disponibilidade de nutriente (Obici & Rossetti, 2003). No trabalho de Ruderman & Saha (2006) foi demonstrado que em condições de grande disponibilidade de glicose, o malonil-CoA inibe a oxidação de ácidos graxos.

No hipotálamo, o malonil-CoA é um possível mediador na via de sinalização hipotalâmica que monitora a quantidade de energia do organismo. Nesta via de sinalização, a ACC, a AMPK e a leptina têm papeis fundamentais. O aumento dos níveis de leptina após ingestão de nutrientes diminui a formação da p-AMPK, desta maneira a ACC continua ativa e os níveis de malonil-CoA altos, e como conseqüência ocorre diminuição da fome e aumento da biossíntese de ácidos graxos (Hu et al., 2003).

O malonil-CoA, por ser um marcador de disponibilidade de nutrientes, pode servir como uma ligação entre o metabolismo energético central e a transdução de sinais para os tecidos periféricos via modulação das proteínas AMPK e ACC. Desta forma, torna-se interessante entender como o aumento de nutrientes no hipotálamo que se traduz em aumento de malonil-CoA, pode influenciar as reações metabólicas nos tecidos periféricos, sobretudo o fígado que controla o metabolismo de açúcares e lipídios.

Para isto, utilizamos neste trabalho, injeção intracerebroventricular (ICV) de um indicador de disponibilidade de nutrientes, o citrato. O citrato é um intermediário do ciclo do ácido cítrico formado após a condensação de um acetil-CoA (proveniente das reações de catabolismo) com o oxaloacetato (primeiro intermediário do ciclo do ácido cítrico). Ele é ativador alostérico da ACC e o principal precursor do substrato da ACC, o acetil-CoA citossólico, do qual o malonil-CoA é produzido (Allred et al., 1997). Os experimentos de Saha e Ruderman (2003) mostraram que em condições de alta disponibilidade de nutrientes no músculo, onde foram observados elevados níveis de glicose e insulina circulantes, as concentrações de citrato e malonil-CoA determinadas foram altas. Desta forma, a utilização de citrato intracerebroventricular pode nos fornecer informações a cerca da modulação das enzimas AMPK e ACC no hipotálamo e na periferia, influenciando importantes mecanismos de controle da homeostase energética do corpo.

#### <u>Justificativa</u>

Nos últimos anos diversos fatores têm sido propostos como importantes reguladores da ingestão alimentar e metabolismo energético do corpo. O entendimento destes fatores tornou-se relevante, uma vez que a incidência de doenças metabólicas como a obesidade, diabetes e patologias relacionadas têm alcançado proporções alarmantes. Dentre os fatores que controlam o balanço energético do corpo está a proteína quinase ativada por AMP (AMPK). A AMPK é considerada como um sensor energético da célula e desempenha o papel de integrar sinais hormonais e nutricionais nos tecidos periféricos e no hipotálamo que modulam a ingestão alimentar e o gasto energético (Kahn et al., 2005). Recentemente, tem-se observado que a estimulação da oxidação de ácidos graxos induzida pela AMPK pode estar relacionada ao controle da obesidade e do diabetes tipo II (Ruderman & Saha, 2006). A AMPK fosforila e inibe a atividade da acetil-CoA carboxilase (ACC) cuja função é estimular a síntese de ácidos graxos pela conversão de acetil-CoA em malonil-CoA. No hipotálamo, o malonil-CoA é um possível mediador na via de sinalização hipotalâmica que monitora a quantidade de energia do organismo. O malonil-CoA, por ser um marcador de disponibilidade de nutrientes, pode servir como uma ligação entre o metabolismo energético central e a transdução de sinais para os tecidos periféricos via modulação das proteínas AMPK e ACC.

#### <u>Objetivos</u>

Assim, baseado nas importantes funções da AMPK, ACC e malonil-CoA para o controle do metabolismo glicídico e lipídico da célula, foi de nosso interesse investigar o efeito do citrato, um intermediário metabólico e ativador alostérico da ACC, sobre a via

AMPK/ACC hipotalâmica, os sinais neurais de saciedade e a homeostase da glicose. Portanto, os objetivos deste presente estudo foram:

1. Determinar o efeito do citrato sobre a AMPK e ACC hipotalâmicas e o controle da fome

2. Avaliar a modulação, pelo citrato, da expressão de neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos no hipotálamo.

3. Avaliar o efeito do citrato, administrado por via ICV, sobre a AMPK hepática.

4. Analisar o efeito do citrato administrado por via ICV na homeostase da glicose: captação de glicose, neoglicogênese e transdução do sinal da insulina.

5. Estudar o papel dos receptores  $\beta$  adrenérgicos no efeito do citrato administrado por via ICV.

#### Material e Métodos:

#### 1) Animais experimentais

Nos nossos experimentos foram utilizados ratos (*Rattus norvergicus*) 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, oferecida *ad libitum*, assim como água. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco por gaiola) sob condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}$  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 1044-1.

#### 2) Cirurgia Estereotáxica

Para a cirurgia de implantação da cânula no ventrículo lateral do hipotálamo, utilizamos ratos de 08 semanas de idade e peso corpóreo entre 250 – 300g. Os animais foram previamente anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de 1:1 (0,8 ml) de cloridrato de cetamina (50 mg/ml) e diazepan (5,0 mg/ml) e os reflexos corneano e pedioso dos animais foram testados para só então serem posicionados no aparelho de estereotaxia para implantação da cânula. Para a inserção correta da cânula no ventrículo lateral, seguimos as coordenadas do Atlas Paxinos-Watson (Paxinos et al., 1980) que variam de acordo com o peso do animal e se baseiam no valor do bregma. Em ratos de aproximadamente 250-300 g as coordenadas utilizadas foram: Antero Posterior (AP): 0,2 mm; Lateral (L): 1,5 mm; Profundidade (P): 4 mm.

#### 3) Infusão intracerebroventricular

Após o período de uma semana de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos a um teste de resposta de ingestão hídrica subseqüente ao tratamento com angiotensina II (2,0 μl de solução 10<sup>-6</sup> M), para avaliação da adequação da posição da cânula. Ratos com resposta positiva à angiotensina II foram selecionados e utilizados nos experimentos. Animais de cada situação experimental receberam 2,0 μl ICV de salina ou drogas nas concentrações descritas abaixo.

#### 4) Protocolo de tratamento com as drogas:

#### 4.1) 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<sup>-2</sup>M de citrato (20 nmoles). O tratamento consistia em duas injeções de citrato. A primeira acontecia às 18:00h do dia anterior à cirurgia de retirada dos tecidos e a segunda injeção era dada 30 minutos antes da extração dos tecidos.

## 4.2) Protocolo para o tratamento com adenina 9- $\beta$ -D-arabinofuranosideo (ARA-

#### A):

Nos experimentos onde os animais foram tratados com a droga inibidora da AMPK adenina 9-β-D-arabinofuranosideo (ARA-A), os animais canulados receberam injeção intracerebroventricular (ICV) de 2 nmoles de ARA-A 30 minutos antes da extração dos tecidos.

#### 4.3) Protocolo para o tratamento com SR59230A:

Para os experimentos de inibição dos receptores  $\beta_3$  adrenérgicos, os animais foram tratados com a droga antagonista de receptores  $\beta_3$  adrenérgicos SR59230A na dose de 0,1mg/kg de peso corpóreo. O tratamento consistia de injeção intraperitoneal da droga 1 hora antes da injeção de citrato.

#### 4.4) Protocolo para o tratamento com insulina:

O tratamento com insulina consistia de injeção de 0,2 mL de insulina (10<sup>-4</sup>M) na veia cava dos animais (iv). Quando os experimentos visavam analisar proteínas da cascata de sinalização da insulina como IR, IRS1 e IRS2, o fígado foi retirado exatamente 30 segundos após a injeção de insulina. Para a análise de proteínas como a AKT e de outras vias de sinalização, o fígado foi retirado 1 minuto e 30 segundos após o estímulo da insulina. O tecido adiposo epididimal e o músculo *sóleo* foram retirados com, respectivamente, 4 minutos e 30 segundos e 5 minutos após injeção de insulina para a avaliação da fosforilação da AKT. A extração do hipotálamo aconteceu imediatamente após a retirada dos tecidos.

#### 5) Avaliação da ingestão alimentar e peso corpóreo:

Os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas e mantidos com ração e água *ad libitum*. Às 18 h os ratos foram submetidos ao tratamento com 20 nmoles de citrato por via ICV e a ingestão alimentar num período de 12 horas foi determinada pela aferição da diferença de peso entre o alimento oferecido e o alimento restante na gaiola. O tratamento com citrato se manteve por 7 dias. Os animais controle receberam solução fisiológica durante o mesmo período de tratamento dos animais citrato.

Os pesos corpóreos dos animais também foram medidos diariamente durante o tratamento de 7 dias com citrato ou solução fisiológica.

# 5.1) Avaliação do efeito do citrato na ingestão alimentar de ratos mantidos em jejum:

Os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas e mantidos em jejum de 08 horas. Às 18 h os ratos foram submetidos ao tratamento com 20 nmoles de citrato por via ICV e a ingestão, após 04 horas, foi determinada pela aferição da diferença de peso entre o alimento oferecido e o alimento restante na gaiola. Os animais controle receberam solução fisiológica durante o mesmo período de tratamento dos animais com citrato.

#### 6) Medidas bioquímicas e hormonais:

Para as medidas de glicose plasmática, amostras de sangue foram coletadas por lancetamento da cauda do animal. Para a determinação dos níveis séricos de insulina e corticosterona, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (IP) com uma mistura de 1:1 de cloridrato de cetamina (50 mg/ml) e diazepan (5,0 mg/ml) e as amostras de sangue foram coletadas por punção do plexo venoso retro ocular, utilizando-se para isso, capilares de vidro.

A glicose plasmática foi medida pelo método da glicose oxidase (Trinder, 1969) e os níveis séricos de insulina e corticosterona foram medidos seguindo-se as especificações determinadas pelos Kits de ELISA da Lynco Inc e DSL Inc, respectivamente.

Para a execução destes experimentos, os animais permaneceram em jejum de 12 horas.
# 7) Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT):

O teste de tolerância à glicose foi realizado após jejum noturno de 8 horas. Os ratos foram anestesiados com uma mistura de 1:1 (0,8 ml) de cloridrato de cetamina (50 mg/ml) e diazepan (5,0 mg/ml). 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. Amostras de sangue foram coletadas por lancetamento da cauda nos tempos 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose para as determinações de concentração de glicose e insulina. Os animais receberam citrato (ICV) ou salina (ICV) 30 minutos antes da administração da solução de glicose.

# 8) 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 1:1 (0,8 ml) de cloridrato de cetamina (50 mg/ml) e diazepan (5,0 mg/ml). Após a perda dos reflexos corneano e pedioso, os catéteres foram implantados na veia jugular esquerda (para infusão) e na artéria carótida (para coleta das amostras de sangue), como préviamente 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 12 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 3,6 mU/kg de peso/minuto 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. 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.

No final do clamp, os animais foram sacrificados com injeção (iv) de tiopental sódico.

#### 9) Extração de tecidos:

Para a extração dos tecidos, os animais foram anestesiados por meio da administração intraperitoneal de tiopental sódico (0,8 ml; 15 mg/kg) e a perda dos reflexos pedioso e corneano foi utilizada como controle da anestesia.

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) à 4°C em um homogenizador Politron (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 10 volumes do mesmo tampão de solubilização utilizado para o fígado a 4°C em homogenizador Politron 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 Bradford (Bradford, 1976). Os sobrenadantes contendo as concentrações de proteínas conhecidas foram ressuspendidos em tampão de Laenmli (100 µL de tampão/400 µL de amostra) contendo 100 mmol de DTT e armazenados em biofreezer -80°C até a utilização do material (extrato total) para o imunublotting.

Em alguns casos, o sobrenadante foi utilizado para a técnica de imunoprecipitação.

#### 10) Imunoprecipitação e Imunoblot

#### 10.1) 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. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sepharose 6MB por 2 horas a 4°C e decantados 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-HCI, 10 mM EDTA, 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado retendo-se apenas proteínas precipitadas as (imunocomplexos) (Velloso et al., 1996). Os imunocomplexos foram ressuspendidos em 25 μl de tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/l de DTT.

A imunoprecipitação foi utilizada em todos os ensaios onde os anticorpos contra as proteínas analisadas não eram encontrados nas suas formas fosforiladas. Nestes casos, as amostras foram imunoprecipitadas contra os anticorpos não fosforilados e submetidas ao imunoblot onde um anticorpo específico, marcador de fosforilação, foi adicionado para se ligar aos imunocomplexos.

#### 10.2) Imunoblot

Para a técnica de imunoblot, as amostras, tanto de imunoprecipitado quanto de 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).

#### 11) Análise por RT-PCR

#### 11.1) Extração de RNA de Hipotálamo e Fígado

Após os tratamentos com citrato, as extrações dos hipotálamos e fígados foram realizadas segundo o método de extração de tecidos. O material foi homogeneizado em politron em um volume de 1 mL de Trizol. Após a homogeneização, o material insolúvel foi removido por centrifugação a 12.000xg, 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 12.000xg, 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 12.000xg, por 10 minutos, a 4ºC. Para lavar o RNA, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de etanol 75% e a amostra centrifugada a 7.500xg, por 5 minutos, a 4ºC. 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.

### 11.2) 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 oligo 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, CRH, PEPCK, G6Pase) e RPS29 (utilizado como controle da reação de PCR).

# 11.3) Reações de amplificação

Para as reações de PCR foram sintetizados oligonucleotídeos para as seqüências dos genes do Neuropeptídeo Y (NPY), POMC e CRH e dos genes das proteínas gliconeogênicas fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) e do RPS29 (proteína S29 da subunidade ribossomal 40S de *Drosophila melanogaster*), mostrados na tabela 1.

Oligonucleotídeo	Sequência
NPY sense	5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCT -3'
NPY anti-sense	5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGA -3'
CRH sense	5'-ATCCGCATGGGTGAAGAATA-3'
CRH anti-sense	5'-AAGCGCAACATTTCATTTCC-3'
POMC sense	5'-CTCCTGCTTCAGACCTCCAT-3'
POMC anti-sense	5'- TTGGGGTACACCTTCACAGG-3'
G6Pase sense	5'-CGCTACCTCCAAGTGAATTAC-3'
G6Pase anti-sense	5'-GCGAGAGTAGAAGTAACCATAAC-3'
PEPCK sense	5'-TGCCAGCCAGAGTATATTCACA-3'
PEPCK anti-sense	5'-TTCCCACCGTATCCGCTTC-3'
RPS29 sense	5'-GGAAGAGTGAGCGGCCATCAAGG-3'
RPS29 anti-sense	5'-TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC-3'

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

NPY – Neuropeptídeo Y; CRH - Hormônio Liberador de Corticotrofina; POMC – Propriomelanocortina; G6Pase – Glicose-6-fosfatase; PEPCK – Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase; RPS29 –proteína S29 da subunidade ribossomal 40S de *Drosophila melanogaster*.

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 31 ciclos, respectivamente. Para os genes gliconeogênicos G6Pase e PEPCK, as TM e os ciclos usados foram 53°C e 57°C e 32 e 25 ciclos, 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.

#### 12) Análises Estatísticas

Todos os resultados foram expressos como média ± 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 na ativação da AMPK e ACC hipotalâmicas:

### 1.1) Ativação da AMPK Hipotalâmica:

Para avaliar o efeito do citrato sobre a via AMPK/ACC hipotalâmica, o citrato foi administrado por via intracerebroventricular (ICV) em animais alimentados. Em seguida os animais foram sacrificados para retirada do hipotálamo e detecção do nível de fosforilação da proteína AMPK. Como podemos observar na figura 1A, a fosforilação da AMPK no hipotálamo de ratos tratados com citrato via ICV foi significativamente menor que os animais do grupo controle (tratados com salina). A redução da fosforilação da AMPK foi de cerca de 60% no grupo tratado com citrato se comparado ao grupo controle (116,2  $\pm$  13,4 e 46,48  $\pm$  12,8 para o controle e citrato, respectivamente). O nível de expressão da proteína AMPK não foi modificado pelo tratamento, como também pode ser observado na figura.

# 1.2) Ativação da ACC Hipotalâmica:

Um importante alvo metabólico da AMPK é a enzima ACC e, portanto, o nível de fosforilação desta enzima serve como indicador da atividade da AMPK no tecido. Como podemos observar na figura 1B, os resultados de fosforilação hipotalâmica da ACC corroboram os dados encontrados na avaliação da fosforilação da AMPK. O nível de fosforilação da ACC, do mesmo modo que para a AMPK, foi 63% menor nos animais que receberam citrato  $(39,3 \pm 13,6)$  se comparado aos animais controle  $(105 \pm 10,6)$  e nenhuma alteração na expressão da ACC foi observada pelo tratamento.



Figura 01 – Efeito do citrato nas fosforilações da AMPK (A) e ACC hipotalâmicas (B). Os níveis de fosforilações das proteínas foram determinados após injeção de 20 nmoles de citrato (ICV). Os lisados foram preparados como descrito em Materiais e Métodos, submetidos à SDS-PAGE e realizado imunoblot contra os anticorpos específicos. 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).

\*  $P \le 0,05$  contra os grupos controle (ICV de salina).

 Efeito do citrato e do ARA-A na ingestão alimentar e fosforilação da ACC hipotalâmica:

#### 2.1) Ingestão alimentar:

Para investigar 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. O tratamento com citrato (ICV) diminuiu em 35% a ingestão alimentar dos ratos alimentados *ad libitum* (Figura 2A). 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 do grupo de animais tratados ( $15 \pm 1,1$  gramas de ração após ICV de ARA).

# 2.2) Ativação da ACC Hipotalâmica:

A figura 2B mostra o efeito do citrato e do ARA-A na ativação da ACC hipotalâmica. De acordo com esta figura, o tratamento com ARA-A diminuiu a fosforilação da ACC de maneira similar à fosforilação da ACC medida nos animais tratados com citrato. Após ICV de citrato, o nível de fosforilação da ACC foi 70% menor que o encontrado para os animais que receberam salina (110,3  $\pm$  13,9 para os animais controle e 32,4  $\pm$  7,8 para os animais citrato). A administração de ARA-A promoveu a diminuição (55%) da fosforilação da ACC hipotalâmica em relação aos animais controle (48,7  $\pm$  6,5 após ARA-A e 110,3  $\pm$  13,9 para os animais controle).



Figura 02 – Efeito do citrato na ingestão alimentar (A) e fosforilação da ACC hipotalâmica (B) de ratos *ad libitum*. Os resultados foram determinados após injeção de 20 nmoles de citrato (ICV) ou de 2 nmoles de ARA-A (ICV) . Os lisados foram preparados como descrito em Materiais e Métodos, submetidos à SDS-PAGE e realizado imunoblot contra o anticorpo p-ACC. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 3 experimentos independentes de um total de 10-14 ratos/tratamento. Os blots foram quantificados por densitometria óptica pelo Software Scion Corp. \* P≤0,05 contra os grupos controle (ICV de salina).

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

#### 3.1) Avaliação da ingestão alimentar:

O efeito do citrato na quantidade de ração ingerida pelos animais que foram mantidos em jejum prévio de 08 horas foi determinado (Figura 3A). Neste caso, pudemos observar que a administração de citrato resultou em um efeito ainda maior na diminuição da ingestão alimentar se comparado com o efeito observado nos animais que não foram mantidos previamente em jejum (Figura 2A). Os animais que receberam citrato ingeriram  $2,7 \pm 0,45$  g enquanto os animais que receberam salina ingeriram  $6,5 \pm 0,35$  (diminuição de 58%)

### 3.2) Avaliação da fosforilação da AMPK hipotalâmica:

Na figura 3B 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.



Figura 03 – Efeito do citrato na ingestão alimentar (A) e na fosforilação da AMPK hipotalâmica (B) de ratos mantidos em jejum de 08 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. Os lisados foram preparados como descrito em Materiais e Métodos, submetidos à SDS-PAGE e imunoblotados contra o anticorpo p-AMPK. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 3 experimentos independentes de um total de 10 ratos/tratamento. Os blots foram quantificados por densitometria óptica pelo Software Scion Corp. \* P≤0,05 contra os grupos controle (ICV de salina).

#### 4) Efeito do tratamento crônico com citrato no ganho de peso corpóreo:

Para avaliar se o tratamento crônico com citrato foi capaz de promover redução do peso corpóreo, os animais foram tratados por um período de 7 dias com citrato por via ICV. Nos animais que receberam citrato foi possível observar que, em adição a diminuição na ingestão alimentar o tratamento com citrato provocou alteração significativa no ganho de peso corpóreo. De acordo com a figura 4, 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  $5 \pm 1,25$  gramas no mesmo período de tempo avaliado.

# 5) Efeito do citrato na expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos:

Uma vez que o tratamento com citrato promoveu redução da ingestão de ração, a expressão dos neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos no controle da ingestão alimentar foi avaliada. As figuras 5A e 5B mostram que o citrato aumentou a expressão do gene para os neuropeptídeos anorexigênicos CRH e POMC 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 pelo tratamento com citrato (3vezes) (figuras 5C).



Figura 04 – Efeito do citrato no ganho de peso corpóreo. O ganho de peso foi monitorado durante sete dias consecutivos de tratamento com 20 nmoles de citrato (ICV) ou solução salina (ICV) (controle). Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 8 ratos/tratamento. \* P  $\leq$  0,05 contra o grupo controle.



Figura 05 – Efeito do citrato no nível dos RNAm de CRH (A), POMC (B) e NPY (C) no hipotálamo de ratos submetidos ao jejum. O RNAm total foi extraído dos ratos tratados com citrato (ICV) e com salina (ICV). O tecido foi preparado como descrito em Materiais e Métodos para a obtenção do RNAm. O controle interno usado foi o RNAm do RPS29. \*  $P \le 0,05$  contra o grupo controle.

# 6) Efeito do citrato na captação de glicose:

# 6.1) Teste de Tolerância à Glicose (ip-GTT)

O tratamento com citrato (ICV) induziu maior captação de glicose, como demonstrado pelo teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ip-GTT) (Figura 6A). 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 6B, os níveis de insulina nos animais que receberam citrato foram similares ao grupo controle.

#### 6.2) Clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico

A partir dos resultados obtidos no ip-GTT, a captação de glicose foi avaliada através do clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico de ambos os grupos (controle e tratado com citrato). Com podemos observar através da figura 6C, 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 1,6 vezes maior que o grupo controle (controle:  $18 \pm 2,5$  mg/kg/min e tratado com citrato:  $29,0 \pm 4$  mg/kg/min).



Figura 6 – Efeito do citrato na captação de glicose e no nível de insulina plasmática. A captação de glicose foi avaliada pelo teste de tolerância à glicose (ip-GTT) (A) e através do clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico (C). Para os testes de ip-GTT e insulina (B), os animais receberam 20 nmoles de citrato (ICV) (•) ou salina (ICV) (▲) 30 min antes da administração do bolus de glicose (2.0 g/kg peso corpo). Para o experimento de captação de glicose, insulina humana foi infundida (3.6 mU/kg peso corpo/minuto) e as amostras de sangue dos animais que receberam 20 nmoles de citrato (ICV) ou salina (ICV) foram coletadas em intervalo de 5 minutos para a medida da concentração de glicose plasmática. \*  $P \le 0,05$  contra o grupo controle.

### 7) Avaliação da Produção de Glicose Hepática:

Com base nos resultados de que o citrato melhora a captação de glicose observados nas figuras 6A e 6C, tornou-se interessante avaliarmos o nível de glicose plasmático após injeção intracerebroventricular de citrato. A glicemia foi acompanhada durante 50 minutos após a administração de citrato em animais mantidos previamente em jejum de 12 horas. De acordo com a figura 7, podemos observar que o nível de glicose sanguínea de jejum aumenta significativamente nos primeiros minutos após a injeção ICV de citrato. Os valores de glicemia aumentaram aproximadamente 35%, passando de 100  $\pm$  3,0 mg/dl antes da injeção de citrato para 135  $\pm$  6,6 mg/dl 10 minutos após ICV de citrato. Após 30 minutos da injeção de citrato, o nível de glicose sanguínea diminuiu para aproximadamente 119  $\pm$  3,3 mg/dl.

Quando 2 µL de insulina (10<sup>-4</sup>M) foi administrado por via ICV, 5 minutos antes da injeção ICV de citrato, o aumento na glicemia observado após o tratamento com citrato foi prevenido. O uso de LY294002, um inibidor da PI3K, 30 minutos antes da administração da insulina reverteu parcialmente o efeito da insulina sobre o citrato e a curva glicêmica mostrou um padrão similar ao observado nos animais que receberam apenas o citrato por via ICV.



Figura 7 - Efeito do citrato (ICV) na glicemia de ratos em jejum. 20 nmoles de citrato foram infundidos ICV e o sangue foi coletado nos tempos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 min para a determinação da concentração de glicose. Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo de animais que recebeu citrato (**■**), grupo de animais que receberam insulina ICV de insulina (2  $\mu$ L 10<sup>-4</sup>M) 05 min antes da injeção ICV de citrato (**\***) e grupo de animais que recebeu LY 294002 (ICV) 30 min antes da injeção ICV de insulina e citrato (O). Os dados representam média ± SD, n=5, \* p ≤ 0.05 (Ratos tratados com insulina (**\***) vs ratos tratados com citrato (**■**).

#### 8) Determinação dos Níveis Séricos de Insulina e Corticosterona:

O nível de corticosterona (tabela II) basal ( $635 \pm 108 \text{ ng/ml}$ ) não foi significativamente diferente do nível determinado para os tempos 5 ( $600 \pm 80 \text{ ng/ml}$ ) e 10 min ( $600 \pm 80 \text{ ng/ml}$ ) após a administração do citrato. Contudo, 30 e 60 minutos após administração do citrato, o nível de corticosterona foi significativamente diferente ( $1269 \pm 315 \text{ ng/ml}$  e 1064  $\pm 261 \text{ ng/ml}$ , respectivamente) do nível de corticosterona determinado para os tempos anteriores. Para o grupo que recebeu previamente a insulina e depois o citrato, o comportamento da corticosterona foi signilar. Apenas após 30 minutos da administração do citrato houve diferença em relação ao nível basal.

Como pode ser observado na tabela III, o nível de insulina não variou significativamente durante o período analisado. No intervalo de tempo analisado, o nível máximo de insulina sérica foi de 9,3  $\pm$  1,3 pmol/l, 10 minutos após a administração de citrato. Após 30 e 60 minutos os valores de 8,7  $\pm$  2,5 pmol/l e 8,8  $\pm$  1,9 pmol/l foram determinados, respectivamente. Para todos os tempos determinados, as diferenças observadas em relação ao nível basal (8,5  $\pm$  2,0 pmol/l) não foram significativas.

# Tabela II: Efeito do citrato (ICV) nos níveis de corticosterona no sangue

O nível de corticosterona (ng/ml) foi determinado após diferentes tempos de administração de citrato. Os valores representam média ± SD de 5 animais.

\*p  $\leq$  0.05 (30 e 60 minutos vs basal e 5 minutos), # p  $\leq$  0.05 (30 minutos vs basal e 5 minutos).

	Corticosterona (ng/ml)	
Tempo (min)	Citrato (ICV)	Citrato (ICV) + Insulina (ICV)
Basal	$635\pm108$	707 ± 144
5 min	$600\pm80$	667 ± 77
10 min	$600\pm80$	$739 \pm 107$
30 min	1269 $\pm$ 315 *	$1311 \pm 233 \text{ #}$
60 min	1064 $\pm$ 261 *	$936 \pm 148$

# Tabela III: Efeito do citrato (ICV) na concentração de insulina no sangue

O nível de insulina (pmol/l) foi determinado após diferentes tempos de administração de citrato.

Os valores representam média  $\pm$  SD de 5 animais

-	Insulina (pmol/l)
Tempo (min)	
	Citrato (ICV)
Basal	$8.5\pm2.0$
10 min após citrato	$9.3 \pm 1.3$
30 min após citrato	$8.7 \pm 2.5$
60 min após citrato	8.8 ± 1.9

#### 9) Efeito do citrato na expressão das enzimas gliconeogênicas (PEPCK e G6Pase):

O tratamento com citrato induziu aumento na expressão de enzimas importantes para a gliconeogênese hepática, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase). Para este experimento, os animais permaneceram em jejum de 12 horas e o fígado foi extraído como descrito em Material e métodos. A análise da expressão foi realizada por RT-PCR.

Como pode ser observada na figura 8A, a expressão da PEPCK aumentou cerca de 90% após o tratamento com citrato quando comparada à expressão dos animais que receberam apenas salina. De maneira similar, a expressão da G6Pase também foi aumentada após tratamento com citrato ICV. Os animais que receberam citrato (ICV) apresentaram aumento de 40% na expressão da G6Pase em comparação aos animais controle (figura 8B).



Figura 8 – Efeito do citrato na expressão do RNAm de PEPCK e G6Pase do fígado de ratos tratados com citrato (ICV) ou com salina (ICV). Os ratos foram mantidos em jejum e receberam 20 nmoles de citrato ou solução salina (ICV) 30 minutos antes da extração do fígado. A obtenção do RNAm do fígado foi realizada segundo Material e Métodos. A análise da expressão de PEPCK (A) e G6Pase (B) foi realizada por RT-PCR. O controle interno usado foi o RNAm de RPS29. Os resultados representam média  $\pm$  SD de 5 animais. \* p  $\leq$  0.05 (citrato vs animais controle).

#### 10) Efeito do citrato na ativação da AMPK e ACC hepáticas:

As figuras 9A e 9B mostram a ativação hepática da AMPK e da ACC, respectivamente. Para este experimento, os animais permaneceram em jejum de 12 horas e foi possível observar que a administração de citrato ICV diminuiu o nível de p-AMPK em cerca de 80% se comparado aos animais controle ( $78 \pm 14,3 = 350 \pm 25,8$  para os animais citrato e controle, respectivamente). Os animais que receberam citrato ICV na presença da insulina na cava apresentaram ainda maior inibição da fosforilação da AMPK, com diminuição de cerca de 90% na p-AMPK quando comparado ao grupo controle ( $32 \pm 6,9$  para citrato+insulina e  $350 \pm 25,8$  para o grupo controle).

Baseados no fato de que o citrato injetado no SNC promoveu alterações no nível de fosforilação da AMPK hipotalâmica e periférica, observamos o efeito da administração da droga antagonista do receptor  $\beta_3$  (SR59230A) na modulação da AMPK hepática por citrato. O efeito do citrato sobre a fosforilação da p-AMPK foi bloqueado significativamente após injeção do inibidor do receptor  $\beta_3$ , tanto na ausência quanto na presença da insulina.

Como mostrado na figura 9A, o grupo de ratos que recebeu inibidor  $\beta_3$  e posterior ICV de citrato mostrou fosforilação da AMPK 3,4 vezes maior que o grupo de animais que só recebeu citrato ICV (267 ± 23,9 para os animais inibidor+citrato e 78 ± 14,3 para os animais citrato). A diminuição da ativação da AMPK induzida por citrato também foi impedida nos animais que receberam citrato (ICV) e insulina (cava) após injeção da droga SR59230A, estes animais mostraram nível de p-AMPK significativamente maior que os animais que não receberam o antagonista do receptor  $\beta_3$  (citrato+insulina).

Para avaliar se a alteração do nível de p-AMPK refletiu em queda na atividade quinase da enzima, a fosforilação da ACC foi determinada. 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 9B, a fosforilação da ACC nos animais tratados com citrato foi cerca de 76% menor que o grupo controle.



Figura 9 – Efeito do citrato na ativação da AMPK e ACC hepáticas. As ativações da AMPK (A) e da ACC (B) foram medidas em ratos submetidos ao jejum e tratados com injeção ICV de citrato (20 nnoles). O efeito do citrato na ativação da AMPK foi observado após tratamento com SR 59230A (0.1 mg/kg peso corpóreo) na ausência ou na presença de insulina (4 nmoles, iv). Os lisados foram preparados como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados representam média  $\pm$  SD de 5 ratos/tratamento. Os blots foram quantificados por densitometria óptica pelo Software Scion Corp. Para p-AMPK P≤0,05 \*B vs A, \*\*C vs A, & E vs C <sup>++</sup>F vs C. Para p-ACC P≤0,05 \* citrato vs controle.

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

O efeito do citrato na sinalização hepática da insulina foi observado monitorando-se as alterações nos níveis de fosforilação das moléculas envolvidas na cascata da sinalização da insulina (IR, IRS1, IRS2, AKT). O nível de fosforilação foi medido na ausência e na presença de injeções intracerebroventriculares (ICV) de 20 nmoles de citrato. Para um melhor monitoramento da ativação da sinalização desencadeada pela insulina, 0,2 mL de insulina 10<sup>-4</sup>M foi injetada na veia cava dos animais e o tecido foi retirado nos tempos correspondentes à ativação específica das moléculas da cascata de sinalização da insulina, como descrito em Material e métodos.

Os animais permaneceram em jejum de 12 horas e foram divididos em 6 grupos: grupo controle (C), grupo controle que recebeu injeção de insulina na cava (C+), grupo de animais que recebeu citrato ICV (Cit), grupo que recebeu citrato ICV e posterior injeção de insulina cava (Cit+), grupo de animais que recebeu ARA-A na (ARA-) intracerebroventricularmente e grupo de animais que recebeu ICV de ARA-A e posterior injeção de insulina na cava (ARA+).

A figura 10A 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 ICV de citrato induziu maior ativação do IR que nos animais do grupo controle. Esta maior ativação foi observada nos animais que receberam ou não estímulo de insulina na cava. O nível de fosforilação do IR dos animais que receberam citrato, na ausência da insulina (Cit-), foi significativamente maior se comparado aos animais controle também na ausência de insulina (C-). Após o estímulo de insulina na cava, o nível de fosforilação do IR os animais controle estimulados por insulina (C+), com a fosforilação do IR encontrado nos animais controle estimulados por insulina (C+), com a

Para avaliarmos a importância da inibição hipotalâmica da AMPK na ativação do IR, nós administramos injeção ICV de 2 nmoles de 9- $\beta$ -D-arabinofuranosideo (ARA-A), um inibidor competitivo da AMPK amplamente utilizado. Neste caso, observamos que a fosforilação do IR mostrou comportamento similar ao encontrado após a utilização do citrato. A fosforilação do IR no grupo ARA-A foi 146 % maior se comparado ao grupo controle, ambos na ausência de insulina (13 ± 1,3 no grupo controle e 32 ± 5,8 nos animais tratados com ARA-A). Após injeção de insulina, a fosforilação do IR no grupo ARA-A permaneceu maior que no grupo controle (C+), o tratamento com ARA-A aumentou a fosforilação do IR de 103 ± 12,2 no grupo controle para 298 ± 20 para o grupo ARA-A (figura 10A).

Com base nas figuras 10B, 10C e 10D, podemos observar que o sinal de insulina se propagou para os demais membros da cascata de sinalização com maior intensidade após o uso do citrato.

A figura 10B mostra a ativação do IRS1 (substrato 1 para o receptor de insulina) após administração de citrato ICV, na ausência e presença da insulina. Após injeção ICV de citrato, o nível de fosforilação do IRS1, na presença de insulina, foi aproximadamente 140% maior quando comparado ao grupo de animais controle na mesma condição. Resultados similares foram encontrados com a administração de ARA-A, neste caso, os animais que receberam ARA-A na presença de insulina, mostraram fosforilação do IRS1 122% maior que os animais que receberam salina (controle) (227,6  $\pm$  26,5 para os animais ARA-A e 102,2  $\pm$  23 para os animais controle).

Na figura 10C podemos observar a fosforilação do IRS2 (substrato 2 para o receptor de insulina), nas mesmas situações que para a determinação da ativação do IRS1. Do mesmo modo, o IRS2 mostrou-se mais fosforilado após o tratamento com citrato na presença da insulina, se comparado aos animais controle. Através desta figura podemos

observar que o citrato provocou aumento no nível de fosforilação do IRS2 em cerca de 2,7 vezes em relação ao controle (299,8  $\pm$  25,3 e 112,3  $\pm$  13,7 para os grupos citrato e controle, respectivamente).

Com base nesta figura, podemos perceber também que o tratamento com ARA-A provocou aumento da ativação do IRS2 similar ao tratamento com citrato. A fosforilação do IRS2, medida após ICV de ARA-A, na presença de insulina mostrou-se maior em cerca de 3 vezes quando comparada ao nível de fosforilação do IRS2 encontrado nos animais controle ( $323,7 \pm 28,8$  para o grupo ARA-A e  $112,3 \pm 13,7$  para o grupo controle).

A figura 10D mostra um evento posterior de ativação da cascata de sinalização da insulina. Após a fosforilação do IR, IRS1 e IRS2, eventos são desencadeados, via Pl3kinase, que levam a fosforilação e ativação de uma proteína chamada PKB ou AKT. O citrato, da mesma maneira que fez para IR e seus substratos, induziu uma maior fosforilação da AKT em comparação a fosforilação da AKT encontrada nos animais controle, tanto na ausência quanto na presença de insulina.

Quando o citrato foi administrado nos animais que não receberam insulina na cava, a fosforilação da AKT se mostrou cerca de 3,75 vezes maior que a encontrada nos animais controle ( $45 \pm 18$  para os animais que receberam citrato e  $12 \pm 1,5$  para os animais controle). Nos animais que receberam citrato e insulina na cava, o padrão de fosforilação manteve-se semelhante ao observado para os outros elementos da cascata da insulina, com um aumento de aproximadamente 155% no nível de p-AKT se comparado aos animais controle estimulados por insulina ( $306 \pm 28$  após icv de citrato e 197 ± 22 para os animais controle). O aumento da fosforilação e conseqüente ativação da AKT parecem confirmar o efeito sugerido do citrato na indução da propagação mais sensível do sinal da insulina.

O tratamento com ARA-A induziu aumento na fosforilação da AKT de maneira similar ao efeito do citrato. Os animais que receberam ARA-A na ausência de insulina apresentaram fosforilação da AKT de 176  $\pm$  21, enquanto que os animais que receberam ARA-A ICV e insulina na cava mostraram nível de fosforilação de 278  $\pm$  26 (figura 10D).



Figura 10 – Efeito do citrato (ICV) na transdução do sinal da insulina no fígado de ratos submetidos ao jejum. (A) Fosforilação do IR, (B) fosforilação do IRS1, (C) fosforilação do IRS2, (D) fosforilação da AKT. Os resultados foram normalizados pelos imunoblot da expressão das proteínas não fosforiladas (E). O efeito do citrato (20 nmoles) foi medido na presença e ausência da insulina (4 nmoles,iv), como descrito em Materiais e Métodos. O efeito do ARA-A (2 nmoles, ICV) também foi medido na presença e ausência da insulina. Lisados foram preparados segundo Material e Métodos. Os resultados representam media  $\pm$  SD de 5 animais/tratamento. p  $\leq$  0.05 to \*A vs B; <sup>&</sup>D vs B; <sup>+</sup>F vs B.

# 12) Efeito do citrato na transdução do sinal da insulina no tecido adiposo e músculo esquelético:

A fosforilação da AKT no tecido adiposo epididimal e no músculo também foi aumentada após tratamento com citrato.

De acordo com a figura 11A, o citrato aumentou em 140% a fosforilação da AKT no tecido adiposo em relação aos animais tratados com salina ( $12 \pm 3,2$  para os animais citrato e  $5 \pm 0,7$  para os animais controle). Quando a fosforilação da AKT foi medida na presença de insulina, o citrato aumentou a p-AKT em aproximadamente 170% ( $117 \pm 22$  para os animais tratados com citrato e  $69 \pm 10,3$  para os animais controle, ambos na presença de insulina). A fosforilação da AKT também aumentou quando os animais receberam ARA-A (ICV), neste caso a p-AKT passou de  $5 \pm 0,7$  nos animais controle para 51  $\pm 9,1$  após administração de ARA-A), ambos na ausência de insulina. Quando ARA-A (ICV) foi administrado na presença de insulina, a fosforilação da Akt aumentou em 55% em relação aos animais tratados com solução salina na presença de insulina.

Com base na figura 11B, podemos observar que o citrato também induziu maior fosforilação da AKT no músculo esquelético. Após tratamento com citrato (ICV) a fosforilação da AKT foi cerca de 80% maior que nos animais controle (9  $\pm$  2,6 para os animais citrato e 5  $\pm$  0,4 para os animais controle). O efeito do citrato na p-AKT foi ainda maior na presença da insulina, induzindo aumento da fosforilação em aproximadamente 2,7 vezes em relação ao grupo controle (C+).

O tratamento com ARA-A apresentou efeito semelhante ao encontrado após tratamento com citrato. As animais que receberam ARA-A, na presença da insulina, mostraram nível de fosforilação da AKT 1,8 vezes maior que o nível de p-AKT dos animais controle também na presença da insulina (96,1  $\pm$  11,9 para os animais ARA-A e 51  $\pm$  7 para os animais controle).



Figura 11 – Efeito do citrato na fosforilação da AKT no tecido adiposo epididimal (A) e no músculo esquelético (B). Citrato (20 nmoles) foi administrado (ICV) 30 minutos antes da insulina (4 nmoles-iv) em ratos submetidos ao jejum. ARA-A (2 nmoles, ICV) foi administrado 30 minutos antes da extração dos tecidos. Lisados foram preparados segundo Material e Métodos, submetidos à SDS-PAGE e realizado imunoblot com p-AKT. Os resultados foram normalizados pelos imunoblot com AKT. Os resultados representam media  $\pm$  SD de 5 animais/tratamento. Os blots foram quantificados pelo Scion Corp Software. p  $\leq$  0.05 to \*B vs A; <sup>&</sup>D vs B; <sup>+</sup>F vs B.

13) Efeito da inibição  $\beta$  adrenérgica na transdução do sinal da insulina induzida pelo citrato no fígado:

A transdução do sinal da insulina também foi analisada após bloqueio do sinal  $\beta$  adrenérgico pelo SR59230A (inibidor de receptores  $\beta_3$ ) como pode ser observado na figura 12.

Nos grupos onde os animais receberam ICV de citrato após o tratamento com a droga SR59230A (IP), pudemos observar que o efeito potencializador do citrato sobre a fosforilação do IR foi diminuído tanto na presença quanto na ausência de insulina (figura 12A). A diminuição da fosforilação do IR induzida por citrato nos animais tratados previamente com inibidor, foi de aproximadamente 50% se comparado à fosforilação do IR nos animais citrato (71+/- 11,13 e 141 +/- 10, respectivamente) na ausência de insulina, a diminuição da fosforilação do IR foi de cerca de 40% em relação à fosforilação induzida por citrato na presença de insulina (183 +/- 20,22 para o grupo inibidor+citrato e 299,33 +/- 31,62 para os animais do grupo citrato).

A atividade da AKT também foi alterada após administração (IP) do inibidor  $\beta_3$  (SR59230A) e, do mesmo modo que para o IR, os animais que receberam previamente SR59230A tiveram o efeito do citrato sobre a AKT diminuído, como pode ser observado na figura 12B.

O nível de fosforilação da AKT passou de  $69 \pm 4,2$  nos animais que só receberam citrato para  $35 \pm 3,1$  quando o citrato foi administrado aos animais que haviam sido tratados com SR59230A. Nos ensaios onde os animais receberam SR59230A, citrato (ICV) e posterior injeção de insulina (cava), pudemos observar fosforilação de AKT em níveis menores do que os encontrados para os animais que só receberam citrato e

estímulo de insulina na cava (251  $\pm$  5,2 para os animais inibidor+citrato e 465  $\pm$  36,3 para os animais citrato).


Figura12 – Efeito do citrato e do  $\beta$ 3 antagonista SR59230A na fosforilação do IR (A) e da AKT (B) no fígado de ratos em jejum. Os ratos foram tratados com citrato (20 nmoles) 30 minutos antes da injeção de insulina (4 nmoles, iv). A administração de SR 59230A (0,1 mg/kg peso corpo) foi realizada via intraperitoneal 1 hora antes da injeção de citrato. Lisados foram preparados segundo Material e Métodos, submetidos a SDS-PAGE e realizado imunoblot com os anticorpos específicos. Os resultados foram normalizados pelos imunoblot com os anticorpos para as proteínas totais. Os resultados representam media  $\pm$  SD de 5 animais/tratamento. Os blots foram quantificados por densitometria óptica pelo Software Scion Corp.

 $p \leq 0.05$  to \*B vs A; &D vs B; +F vs D.

## <u>Discussão</u>

O controle da homeostase de glicose em mamíferos é governado pelo balanço entre a absorção intestinal de glicose, produção endógena de glicose pelo fígado e captação e metabolismo de glicose pelos tecidos periféricos. Para que a glicemia normal seja mantida, vias metabólicas são ativadas e reguladas num mecanismo adaptativo de controle do balanço energético (Viollet et al., 2003).

O hipotálamo é tido como principal local de integração de sinais periféricos e controle da homeostase energética. Neste local existem receptores para fatores periféricos indicadores de saciedade e dos níveis das reservas energéticas tais como, a insulina e a leptina. Logo após a ingestão alimentar, os níveis de glicose e insulina plasmáticos estão aumentados levando a ativação dos receptores para insulina (IR) nos neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo. Agindo nestes neurônios a produção de neuropeptídeos anorexigênicos irá aumentar e os orexigênicos serão inibidos, tendo como conseqüência a diminuição da ingestão alimentar (Schwartz et al., 2000). O mesmo mecanismo é atribuído à leptina a partir da sua ligação aos receptores hipotalâmicos.

No hipotálamo, a via da AMPK tem sido proposta como capaz de mediar à adaptação celular frente às variações ambientais que diminuem a quantidade de ATP celular. Como resultado, sua ativação inibe vias de consumo de energia, como as vias anabólicas e promove a indução de vias catabólicas, como glicólise, captação de glicose e oxidação de ácidos graxos, além de aumentar a fome por agir em núcleos hipotalâmicos responsáveis pelo controle do comportamento alimentar. Assim, a presença desta enzima no sistema nervoso central é de extrema importância para o controle dos níveis de ingestão calórica e de consumo de energia na célula, tanto no sistema nervoso central como nos tecidos periféricos.

No presente trabalho, nós avaliamos o efeito do citrato, um intermediário metabólico sobre a atividade da via AMPK/ACC no hipotálamo e seu efeito no controle do metabolismo de glicose da célula.

O citrato é um intermediário do ciclo de Krebs e é formado a partir da condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato no interior da mitocôndria. O acetil-CoA é um indicador de disponibilidade de nutrientes e é proveniente das reações de oxidação (oxidação de carboidratos e aminoácidos e β-oxidação). No citoplasma a concentração de citrato pode aumentar em condições de aumento da disponibilidade de energia (Obici et al., 2003). Assim, guando a ingestão alimentar está aumentada, muito acetil-CoA é formado como conseqüência das reações de oxidação dos nutrientes e muito citrato é formado no ciclo do ácido cítrico. No citoplasma o citrato também funciona como ativador alostérico da acetil-CoA carboxilase (ACC), principal enzima da biossíntese de ácidos graxos, cuja função é carboxilar o acetil-CoA produzindo malonil-CoA (Allred et al., 1997). A concentração de malonil-CoA funciona como um sensor molecular do estado energético da célula (Hu et al., 2003 e Obici et al., 2003). De acordo com estes autores, o aumento de malonil-CoA na célula resulta em alterações importantes no metabolismo de maneira a inibir as vias catabólicas e ativar as vias anabólicas. O nível de malonil-CoA na célula está sob controle das enzimas acetil-CoA carboxilase (ACC) e malonil-CoA descarboxilase (MCD). Estas enzimas são moduladas através da atividade serina-quinase da AMPK que inibe a ACC e ativa a MCD por fosforilação. Assim, podemos afirmar que a modulação da AMPK é um mecanismo importante de controle dos níveis de malonil-CoA na célula.

Entre os efeitos descritos na literatura decorrentes do aumento de malonil-CoA no hipotálamo, podemos citar a diminuição da fome (Ruderman et al., 2003). Nossos dados mostram que a administração de citrato por via ICV resulta em significativa queda na fosforilação da AMPK e ACC no hipotálamo (figura 1A e B). Este efeito foi acompanhado

pela redução da ingestão alimentar (figura 2A), sugerindo que, nesta condição, a ativação alostérica da ACC pela presença do citrato e a sua menor fosforilação resultaria em maior atividade e, consequentemente, maior produção de malonil-CoA. É importante ressaltar que a dose de citrato utilizada no estudo foi similar aos níveis de citrato encontrados no plasma e no líquor em períodos pós-prandiais (Hoffman et al., 1993).

O envolvimento da AMPK é reforçado pelo resultado obtido em animais que receberam ARA-A por via ICV. Este composto é um inibidor competitivo da AMPK e, portanto, sua presença sinalizaria de maneira similar ao citrato. De fato os animais que receberam ARA-A apresentaram significativa redução da ingestão alimentar se comparado ao grupo controle (figura 2A). A média de ração ingerida pelos animais do grupo tratado com ARA-A foi próxima à determinada para os animais que receberam citrato, sugerindo que a AMPK foi inibida e a ACC se encontrava menos fosforilada nesta condição. Esta possibilidade foi confirmada através do *imunoblot* da ACC hipotalâmica (figura 2B) nestas três condições (controle, citrato e ARA-A).

Para investigar se o sinal de saciedade desencadeado pelo citrato se sobrepunha ao efeito orexigênico promovido pelo jejum, foi administrado citrato em animais mantidos em jejum de 8 horas. Nestes animais, 4 horas após a administração do citrato, o efeito anorexigênico (60% de redução da ingestão) foi bastante sensível (figura 3A). Nestes animais também foi observado que o aumento da fosforilação da AMPK hipotalâmica induzida pelo jejum foi significativamente reduzida pela presença do citrato (figura 3B).

A redução na ingestão calórica dos animais tratados com citrato resultou em um balanço energético negativo desde que, quando os animais foram tratados por até 7 dias consecutivos com citrato, apresentaram significativa redução no ganho de peso corpóreo (figura 4). Outros autores também têm demonstrado que a modulação da atividade da

AMPK hipotalâmica resulta em alteração do peso corpóreo (Minokoshi et al., 2004; Andersson et al., 2004).

De acordo com Kim et al. (2004) e Lee et al. (2005), a modulação da fome e gasto calórico estão relacionados com a capacidade da AMPK em modular a expressão de neuropeptídeos anorexigênicos e orexigênicos no hipotálamo. Nossos resultados mostram que o tratamento com citrato promoveu aumento na expressão dos neuropeptídeos anorexigênicos POMC e CRH, enquanto que o orexigênico NPY encontrava-se diminuído (figura 5). De acordo com Kim et al. (2004) a AMPK modula a fome por induzir a expressão de neuropeptídeos orexigênicos hipotalâmicos como o NPY. O grupo de Lee et al. (2005), usando linhagem de células neuronais, conseguiu mostrar que em condições de privação de glicose, a fosforilação da AMPK é estimulada e, por sua vez, estimula a expressão do neuropeptídeo hipotalâmico orexigênico AgRP. No mesmo trabalho, as células foram suplementadas com piruvato e a suplementação provocou diminuição da fosforilação da AMPK seguida de diminuição da expressão de AgRP. O resultado obtido por Lee et al. (2005), foi corroborada por nossos resultados desde que a presença de um indicador da disponibilidade de nutrientes na célula, tal como citrato ou piruvato, é capaz de modular a atividade da AMPK.

As vias autonômicas simpáticas e parassimpáticas são importantes para o funcionamento e a comunicação entre os órgãos. Na década de 60, os trabalhos de Shimazu and Fukuda, 1965, Shimazu et al., 1966 e Shimazu, 1967 mostraram que nervos autonômicos do hipotálamo controlam o metabolismo hepático de açúcares. Desde então, denervação cirúrgica e drogas que inibem os nervos autonômicos têm sido exploradas para se entender a relação entre os nervos autonômicos e as funções do fígado.

Mais recentemente alguns autores têm sugerido que a modulação da AMPK hipotalâmica também é responsável pela modulação do metabolismo periférico. Han et al.

(2005) demonstraram que a administração de AICAR, um ativador da AMPK, por via ICV resultou em aumento de corticosterona e glucagom circulante. Adicionalmente, tem sido mostrado que a administração de ácidos graxos de cadeia longa no 3º ventrículo induz inibição da produção de glicose e diminuição da ingestão (Morgan et al., 2004). Além disso, os trabalhos de Minokoshi & Kahn, 2003 e Cha et al., 2005 mostram que sinais no hipotálamo que afetam a ingestão alimentar são transmitidos para a periferia a fim de alterar a homeostase energética e de glicose.

De fato, o tratamento com citrato promoveu significativa melhora na captação de glicose observada pelo teste de tolerância à glicose intraperitoneal (GTT) e aumento da sensibilidade à insulina observada pelo clamp euglicêmico/hiperinsulinêmico. É interessante salientar que a melhora na captação de glicose ocorreu sem que a secreção de insulina fosse alterada nos animais que receberam previamente o citrato, indicando que o efeito do citrato deva acontecer pelo aumento da sensibilidade do tecido à insulina e não pela indução de aumento da secreção deste hormônio. Estes dados corroboram o trabalho de Minokoshi et al. (2004) que demonstrou que após a administração de glicose (ICV) o nível de insulina circulante não foi alterado, apesar de o tratamento com glicose ter promovido diminuição da fosforilação da AMPK hipotalâmica e redução da fome, de maneira similar ao observado em nosso modelo.

Nossos resultados também sugerem que a injeção de citrato (ICV) provoca aumento da produção hepática de glicose, como pode ser observado pelo aumento da glicemia em cerca de 30% logo após a injeção do citrato se comparado aos animais que receberam salina (ICV). De acordo com Pocai et al. (2005) a ativação de canais de potássio dependentes de ATP (K<sub>ATP</sub>) hipotalâmicos está relacionada ao controle da produção hepática de glicose e sua ativação pela insulina, é suficiente para diminuir os níveis sanguíneos de glicose através da inibição da gliconeogênese hepática. Para

investigarmos esta hipótese, administramos previamente insulina (ICV) (5 minutos antes do citrato) nos animais tratados com citrato. Nesta condição, a produção de glicose foi prevenida sugerindo que o citrato poderia modular a AMPK, no entanto, sem interferir com a ativação dos canais de potássio. Para confirmarmos que a ativação da via de sinalização da insulina era importante para este efeito, nós administramos LY-294002 (ICV) 30 minutos antes da adição de insulina. Como pode ser observado na figura 7, após a administração (ICV) de insulina, na presença de LY-294002, a insulina não conseguiu prevenir o aumento da glicemia induzido pela administração de citrato (ICV).

O LY-294002 é um inibidor específico de uma proteína chave na cascata de sinalização da insulina, a Pl3Kinase. O uso desta droga tem demonstrado eficiente bloqueio da cascata de sinalização da insulina. O grupo de Grzelkowska, 1999 mostrou que após administração de LY-294002, a síntese protéica muscular induzida por insulina foi consideravelmente diminuída. No trabalho de Roman et al., 2005 podemos observar que a administração de LY-294002 (ICV) impediu a transdução do sinal da insulina na ativação da via Pl3Kinase/AKT no hipotálamo.

A produção de glicose pelo fígado também pode ser estimulada pela ativação da neoglicogênese na presença de costicosterona (Watts et al., 2005). Para descartarmos esta possibilidade, os níveis de corticosterona no sangue foram determinados nos animais que receberam citrato, com e sem tratamento de insulina (ICV). Como pode ser observado na tabela II, o tratamento com citrato não induziu significativo aumento no nível de corticosterona nos tempos avaliados, mostrando que o aumento da glicemia não decorreu da alteração na secreção de corticosterona após o tratamento com citrato. Quando o animal recebeu previamente (5 min) a insulina por via ICV, o nível de corticosterona foi similar ao animal que recebeu apenas o citrato. Assim, desde que o tratamento prévio com insulina preveniu o aumento da glicemia induzido pelo citrato e os

níveis de corticosterona foram similares nos dois grupos (citrato e insulina + citrato), acreditamos que o efeito do citrato possa decorrer da ativação da neoglicogênese hepática por via autonômica simpática.

De fato a análise da expressão da PEPCK e G6Pase no fígado de animais tratados com citrato mostrou aumento nos níveis de RNAm de ambas as enzimas. A expressão de PEPCK aumentou cerca de 90% e a G6Pase apresentou menor (40%), mas significativo, aumento se comparado aos animais do grupo controle (figura 8). Assim, nos parece claro que o tratamento com citrato induz a produção de glicose hepática e que esta não decorre de alterações hormonais. Contudo, é conhecido que o estímulo simpático é também capaz de ativar a neoglicogênese no fígado (Minokoshi et al., 2002) e mais recentemente, tem sido atribuído à proteína TORC2 um importante papel no controle da produção de glicose pelo fígado através do estímulo da expressão das enzimas gliconeogênicas (PEPCK e GG6Pase) (Canettieri et a., 2005; Koo et al., 2005).

A proteína TORC2 é modulada através da sua fosforilação em serina pela AMPK ativada, impedindo sua migração para o núcleo. Desta maneira condições que promovem a inibição da AMPK hepática permitiriam a migração da TORC2 e o aumento da expressão das enzimas neoglicogênicas. Neste sentido, o uso terapêutico da metformina tem como base a ativação da AMPK. O tratamento da hiperglicemia no diabetes tipo II com uso de metformina resulta em ativação da AMPK e, conseqüente, atenuação da gliconeogênese hepática (Zhou et al., 2001, Andreelli et al., 2006).

Em nosso modelo, o tratamento com citrato diminuiu a fosforilação (redução de 35%) e, conseqüente, ativação da AMPK (reduzida fosforilação da ACC) no fígado quando comparado aos animais controle. Este efeito foi prevenido pela administração intraperitoneal prévia de SR59230A (antagonista β3-adrenérgico) (figura 9A). Portanto, apesar da fosforilação da TORC2 não ter sido investigada, nossos resultados sugerem fortemente que a administração de citrato (ICV) é responsável pela inibição da AMPK hepática de maneira dependente da via β-adrenérgica e isto resulta em migração da TORC2 para o núcleo, levando a ativação do programa gliconeogênico.

A homeostase da glicose é coordenada por um conjunto de fatores bioquímicos e fisiológicos que promovem a produção de glicose pelo fígado através da glicogenólise e gliconeogênese como discutido acima. No entanto, a homeostase da glicose tem um componente de importância ímpar: a ação da insulina sobre os diferentes tecidos. A presença deste hormônio no sangue promove alterações metabólicas importantes tais como glicogênese, lipogênese e captação de glicose (Hajduch et al., 2001). Como já discutido anteriormente, o teste de tolerância à glicose mostrou que os animais tratados com citrato (ICV) apresentam captação de glicose mais eficiente que o grupo controle.

Na literatura alguns trabalhos têm mostrado que a ação da leptina (leptina inibe a AMPK) no hipotálamo resulta em melhora na captação de glicose estimulada pela insulina, como observado Mizuno et al. (2001) em ratos OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*) e por Haque et al. (1999) em ratos Wistar. Mais recentemente, Xue & Kahn (2006) e Kim & Lee (2005), em duas revisões sobre o assunto, associaram a atividade da AMPK hipotalâmica e capacidade do sistema nervoso central de modular a fome, o gasto energético e a homeostase da glicose. Portanto, nossos dados reforçam a hipótese de que o citrato administrado no hipotálamo é responsável pela ativação de sinal adrenérgico para os tecidos periféricos.

Uma vez que o efeito do citrato de aumentar a secreção da insulina foi descartado a partir da dosagem da insulina sérica (Tabela III e fig. 6B), nós levantamos a hipótese de que o citrato, através da inibição da AMPK hipotalâmica, poderia potencializar a ação da insulina nos tecidos e com isso melhorar a captação de glicose.

Como pode ser observado na figura 10, o citrato administrado por via ICV aumentou a fosforilação estimulada pela insulina (cava) das proteínas IR (2 vezes), IRS-1 (1,5 vezes), IRS-2 (2,7 vezes) e AKT (1,5 vezes) no fígado se comparado aos animais do grupo que não recebeu citrato (controle). Resultados semelhantes foram observados após a administração de ARA-A (adenosina 9-beta-D-arabinofuranosídeo) no hipotálamo por via ICV. Para todas as proteínas mencionadas anteriormente (IR, IRS e AKT) a administração prévia de ARA-A por via ICV potencializou o efeito da insulina de induzir a fosforilação destas proteínas. O ARA-A tem função análoga ao citrato por ser é um inibidor competitivo da AMPK e, portanto, na sua presença o metabolismo neural refletiria um estado de disponibilidade energética.

E interessante apontar que tanto nos ratos que receberam apenas citrato como nos ratos que receberam apenas ARA-A, a fosforilação basal da AKT apresentava-se aumentada em relação à fosforilação encontrada nos animais que receberam apenas solução salina (controle). Da mesma maneira no tecido adiposo e muscular a fosforilação estimulada pela insulina da proteína AKT foi potencializada pelo citrato ou ARA-A (figura 11). Contudo, quando os animais receberam (intraperitoneal) previamente um antagonista β3-adrenérgico o efeito do citrato sobre a fosforilação do IR e da AKT no fígado foi prevenido (figura 12). Então, a administração central de citrato potencializa o efeito da insulina na fosforilação das proteínas da via e este efeito é dependente da via adrenérgica.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a AMPK hipotalâmica é inibida pela presença do citrato, provavelmente pelo aumento da disponibilidade energética. A inibição da AMPK por este mecanismo resulta em aumento da expressão de neuropeptídeos anorexígenos e conseqüente sinal de saciedade. Perifericamente, a inibição da AMPK hipotalâmica é responsável pela ativação de um sinal adrenérgico

(sistema nervoso central - tecidos periféricos) que modula positivamente o efeito da insulina nos tecidos e aumenta a captação de glicose. Contudo, a inibição da AMPK por si só pode resultar na produção de glicose pelo fígado, até mesmo em animais em jejum. De acordo com trabalhos realizados pelo grupo de Luciano Rosseti (Pocai et al., 2005 e Lam et al., 2005) a ativação do metabolismo energético e a sinalização da insulina no hipotálamo são processos importantes para a inibição da produção de glicose pelo fígado. Estes autores atribuem à ativação de canais de potássio nos neurônios hipotalâmicos o papel de inibir a produção de glicose. Portanto, condições que promovam a inibição da AMPK e não ativam os canais de potássio podem resultar em aumento da glicemia. Este quadro é particularmente importante em quadro de diabetes tipo II e obesidade, desde que nestas 2 doenças o desenvolvimento de resistência hipotalâmica a insulina é verificada.

## <u>Conclusão</u>

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

- Diminuir a ingestão alimentar
- Diminuir a ativação da AMPK hipotalâmica
- Modular a expressão dos neuropeptídeos hipotalâmicos
- Melhorar a sensibilidade à insulina
- Melhorar a captação de glicose
- Estimular a produção de glicose hepática
- Melhorar a transdução do sinal da insulina no fígado, músculo soleo e tecido

adiposo epididimal

## Referências Bibliográficas

Abu-Elheiga, L.; Almarza-Ortega, D. B.; Baldini, A. & Wakil, S. J. Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. **J. Biol. Chem.**, 272, p. 10669-10677, 1997.

Abu-Elheiga, L.; Brinkley, W. R.; Zhong. L.; Chirala, S. S.; Woldegiorgis. G. & Wakil, S. J. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 97, p. 1444-1449, 2000.

Ahima, R. S. & Osei, S. Y. Leptin signaling. Physiol. & Behav., 81, p. 223-241, 2004.
Allred, J. B. & Reilly, K. E. Short-term regulation of acetyl CoA carboxylase in tissues
of higher animals. Prog. Lipid Res., 35, p. 371-385, 1997.

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.

Andreelli, F.; Foretz, M.; Knauf. C.; Cani, P. D.; Perrin, C.; Iglesias, M. A.; Pillot, B.; Bado, A.; Tronche, F.; Mithieux, G.; Vaulont, S.; Burcelin, S. & Viollet, B. Liver AMPKalpha2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not by insulin. **Endocrinology**, 147, p. 2432-2441, 2006.

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. **Endocrinology**, 146(3), p. 1428-1437, 2005.

Assifi, M. M.; Suchankova, G.; Constant, S.; Prentki, M.; Saha, A. K. & Ruderman, N.

B. AMP activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of

starved/carbohydrate-refed rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 289, p. 794-800, 2005.

Barthel, A. & Schmoll, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 285, p. E685–E692, 2003.

Bates, S. H., Steams, W. H. and Schubert, M. STAT3 signaling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. **Nature**, 421, p. 856-859, 2003.

Bittinger, M. A. et al. Activation of cAMP response element-mediated gene expression by regulated nuclear transport of TORC proteins. **Curr.Biol.**, 4, p. 2156-2161 (2004).

Bonora, E.; Zavaroni. I.; Alpi, O.; Pezzarossa, A.; Bruschi, F.; Dall'Aglio, E.; Guerra, L.; Coscelli, C. & Butturini, U. Relationship between blood pressure and plasma insulin in non-obese and obese non-diabetic subjects. **Diabetologia**, 30, p. 719-23, 1987.

Broberger, C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. J. Intern. Med., 258, p. 301-327, 2005.

Brunmair, B.; Staniek, K.; Gras, F.; Scharf, N.; Althaym, A.; Clara, R.; Roden, M.; Gnaiger, E.; Nohl, H.; Waldhausl, W. & Furnsinn, C. Thiazodinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? **Diabetes**, 53, p. 1052-1059, 2004.

Buijs, R. M.; La Fleur, S. E.; Wortel, J.; Van Heyningen, C.; Zuiddam, L.; Mettenleiter,
T. C.; Kalsbeek, A.; Nagai, K. & Niijima, A. The suprachiasmatic nucleus balances
sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate
preautonomic neurons. J. Comp. Neurol., 464, p. 36-48, 2003.

Canettieri, G.; Koo, S. H.; Berdeaux, R.; Heredia, J.; Hedrick, S.; Zhang, X. & Montminy, M. Dual role of the coactivator TORC2 in modulating hepatic glucose output and insulin signaling. **Cell Metab.**, 2, p. 331-338, 2005.

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

Carling, D. AMP-activated protein kinase: balancing the scales. **Biochimie**, 87, p. 87–91, 2005.

Carvalheira, J. B.; Siloto, R. M.; Ignacchitti, I.; Brenelli, S. L.; Carvalho, C. R.; Leite,

A.; Velloso, L. A.; Gontigo, J. A. & Saad, M. J. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. **FEBS Lett.**, 500, p. 119-124, 2001.

Carvalheira, J. B.; Torsoni, M. A.; Ueno, M.; Amaral, M. E.; Araújo, E. P.; Velloso, L. A.; Gontijo, J. A. R.; Saad, M. J. A.; Cross talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. **Obes. Res.** 13, p. 48-57, 2005.

Casteels, K. & Mathieu, C. Diabetic ketoacidosis. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, 4, p. 159–166, 2003.

Cerasi, E. The aetiology of Type II diabetes. In Insulin - Molecular biology to

**pathology**. Ashcroft, F. M. & Ashcroft, S. J. H., Eds.; Oxford University Press, Oxford. 1992. p. 347-381

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. Comm.**, 317, p. 301-308, 2004.

Cha, S. H.; Hu, Z.; Chohnan, S. & Lane, M. D. Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. **Proc. Nat.** 

Acad. Sci. USA, 102, p. 14557-14562, 2005.

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.

Dentin, R.; Girard, J. & Postic, C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. **Biochimie**, 87, p. 81-86, 2005.

Farooqi, I. S.; Keogh, J. M.; Kamath, S.; Jones. S.; Gibson, W. T.; Trussell, R.; Jebb, S. A.; Lip, G. Y. & O'Rahilly, S. Partial leptin deficiency and human adiposity. **Nature**, 414, p. 34-35, 2001.

Flier, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, 16, p. 337-50, 2004.

Folli, F.; Kahn,H.Hansen, C.R.; Bouchie, J. L. & Feener, E. P. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk, **J. Clin. Invest.**, 100, 2158-2169, 1997.

Freund-Mercier, M.J.; Stoeckel, M. E.; Moos, F.; Porte, A. & Richard, P.

Ultrastructural study of electrophysiologically identified neurons in the paraventricular nucleus of the rat. **Cell Tissue Res.**, 216, p. 503–512, 1981.

Friedman, J. M. A war on obesity, not the obese. **Science**, 299, p. 856-858, 2003. Grzelkowska, K.; Dardevet, D.; Balage, M. & Grizard, J. Involvement of the rapamycin-sensitive pathway in the insulin regulation of muscle protein synthesis in streptozotocin-diabetic rats. **J. Endocrinol.**, 160, p. 137-145, 1999.

Gual, P.; Le Marchand-Brustel, Y. & Tanti, J. F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, 87, p. 99-109, 2005.

Guarino, M. P.; Correia, N. C.; Lautt, W. W. & Macedo, M. P. Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACh/NO/cGMP pathway in rat liver. **Am. J. Physiol.** 

Gastrointest. Liver Physiol., 287, p. G527-532, 2004.

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. Biol. Chem.**, 280, p. 32081-32089, 2005.

Hajduch, E.; Balendran, A.; Batty, I. H.; Litherland, G. J.; Blair, A. S.; Downes, C. P. & Hundal, H. S. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells.

Diabetologia, 44, p. 173-83, 2001.

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, p. 2170-2178, 2005.

Haque, M. S.; Minokoshi, Y.; Hamai, M.; Iwai, M.; Horiuchi, M. & Shimazu, T. Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. **Diabetes**, 48, p. 1706-1712, 1999.

Hardie, D. G. & Hawley, S. A. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. **Bioessays**, 23, p. 1112-1119, 2001.

Hardie, D.G.; Carling, D. & Carlson, M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? **Annu. Rev. Biochem.**, 67, p. 821-855, 1998.

Hawley, S. A.; Boudeau, J.; Reid, J. L.; Mustard, K. J.; Udd, L.; Makela, T. P.; Alessi, D. R. & Hardie, D. G. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. **J. Biol. Chem.**, 2, p. 28, 2003.

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. Nat. Acad. Sci. USA**, 100, p. 12624-12629, 2003.

Hudson, E. R.; Pan, D. A.; James, J.; Lucocq, J. M.; Hawley, S. A.; Green, K. A.;

Baba, O.; Terashima, T. & Hardie, D. G. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. **Curr. Biol.**, 13, 861-866, 2003.

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, p. 15-25, 2005.

Kang, L.; Dunn-Meynell, A. A.; Routh, V. H.; Gaspers, L. D.; Nagata, Y.; Nishimura, T.; Eiki, J.; Zhang, B. B. & Levin, B. E. Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. **Diabetes**, 55, p. 412-420, 2006.

Kemp, B. E. 2004. Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. **J. Clin. Invest.**, 113, p. 182–184.

Kessler, A.; Uphues, I.; Ouwens, D. M.; Till, M. & Eckel, J. Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. **Am.** 

J. Physiol. Endocrinol. Metab., 280, p. 65-74, 2001.

Kim, E. K.; Miller, I.; Aja, S.; Landree, L.E.; Pinn, M.; McFadden, J. et al. C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase, **J. Biol. Chem.**, 279, p. 19970-19976, 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, p. 514-520, 2005.

Kim, Y. B.; Uotani, S.; Pierroz, D. D.; Flier, J. S. & Kahn, B. B. In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. **Endocrinology**, 141, 2328-2339, 2001.

Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Ten Eyck, L. F.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S. &

Sowadski, J. M. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. **Science**, 253, p. 414-20, 1991.

Koo, S. H.; Flechner, L.; Qi, L.; Zhang, X.; Screaton, R. A., Shawn, J.; Hedrick, S.; Xu, W.; Boussouar F.; Brindle, P.; Takemori, H. & Montminy, M. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. **Nature**, 437, p. 1109-1114, 2005.

Lam, T. K.; Gutierrez-Juarez, R.; Pocai, A. & Rossetti, L. Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. **Science**, 309, p. 943-947, 2005.

Lautt, W. W.; Macedo, M. P.; Sadri, P.; Takayama, S.; Duarte-Ramos, F. & Legare,

D. J. Hepatic parasympathetic (HISS) control of insulin determined by feeding and fasting.

Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 281, p. G29–G36, 2001.

Lee, K.; Li, B.; Xi, X.; Suh, Y. & Martin, R. J. Role of Neuronal Energy Status in the Regulation of Adenosine 5-\_Monophosphate-Activated Protein Kinase, Orexigenic Neuropeptides Expression, and Feeding Behavior. **Endocrinology**, 146, p. 3-10, 2005.

Lietzke, S. E. *et al.* Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology omains. **Mol. Cell**, 6, p. 385-394, 2000.

Lin, J. et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1a null mice. **Cell**, 119, p. 121-135, 2004.

Minokoshi, Y. & Kahn, B. B. Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. **Biochem. Soc. Trans.**, 31, p. 196-201, 2003.

Minokoshi, Y.; Alquier, T.; Furukawa, N.; Kim, Y. B.; Lee, A.; Xue, B.; Mu, J; Foufelle, 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, p. 569-574, 2004.

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, p. 339-343, 2002.

Mizuno, A.; Murakami, T.; Doi, T. & Shima, K. Effect of leptin on insulin sensitivity in

the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat. Regul. Pept., 99, p. 41-44, 2001.

Morgan, K.; Obici, S. & Rossetti, L. Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated. **J. Biol. Chem.**, 279, p. 31139-31148, 2004.

Muse, E. D.; Obici, S.; Bhanot, S.; Monia, B. P.; McKay, R. A.; Rajala, M. W.;

Scherer, P. E. & Rossetti, L. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. J.

Clin. Invest., 114, p. 232-239, 2004.

Myers, Jr, M. G. 2004. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. **Recent Prog. Horm. Res.**, 59, p. 287-304, 2004.

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

Niswender, K. D.; Gellis, B.; Blevins, J. E.; Carson, M. A.; Schwartz, M. W. & Baskin, D. G. Immunocytochemical detection of phosphatidyl inositol 3-kinase activation by insulin and leptin. **J. Histochem. Cytochem.**, 51, p. 275–283, 2003.

Oben, J. A.; Roskams, T.; Yang, S.; Lin, H.; Sinelli, N.; Li, Z.; Torbenson, M.; Huang.

J.; Guarino, P.; Kafrouni, M. & Diehl, A. M. Sympathetic nervous system inhibition

increases hepatic progenitors and reduces liver injury. **Hepatology**, 38:664–673. 2003<sup>a</sup>.

Obici, R. J.; Fenz, Z.; Tan, J.; Liu, L.; Karkanias, G. & Rossetti, L. Central

melanocortin receptors regulate insulin action. J. Clin. Invest., 108, p. 1079-1085, 2001.

Obici, S. & Rossetti, L. Minireview: Nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. **Endocrinology**, 144, p. 5172-5178, 2003.

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.

Pan, D. A. & Hardie, D. G. A homologue of AMP-activated protein kinase in Drosophila melanogaster is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion. **Biochem. J.**, 367, p.179-186, 2002.

Pocai, A.; Lam, T. K. T.; Gutierrez-Juarez, R.; Obici, S.; Schwartz, G. J.; Bryan, J.; Aguilar-Bryan, L. & Rossetti, L. Hypothalamic KATP channels control hepatic glucose production. **Nature**, 434, p. 1026-1031, 2005.

Porte, Jr, D.; Baskin, D. G. & Schwartz, M. W. Leptin and insulin action in the central nervous system. **Nutr. Rev.**, 60, p. S20–S29, 2002.

Prada, P.; Okamoto, M. M.; Furukawa, L. N.; Machado, U. F.; Heimann, J. C. & Dolnikoff, M. S. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. **Hypertension.**, 35, p. 424-229, 2000.

Randle, P. J.; Garland, P. B.; Hales, C. N.; Newsholme, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, 1, p. 785–789, 1963.

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, p. 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. B. & Saha, A. K. Metabolic Syndrome: Adenosine Monophosphateactivated Protein Kinase and Malonyl Coenzyme A. **Obesity**, 14, p. 25S- 33S, 2006. Ruderman, N. B. The metabolic syndrome. In DeGroot, L. J, & Jameson, J. L., eds.

Endocrinology, 5th edition. Elsevier, Philadelphia, PA, 2006, p. 1149-66.

Ruderman, N. B.; Saha, A.K. & Kraegen, E. W. Minireview: Malonyl CoA, AMPactivated protein kinase, and adiposity. **Endocrinology**, 144, 5166-5171, 2003.

Sakamoto, K.; McCarthy, A.; Smith, D.; Green, K. A.; Grahame, H. D.; Ashworth, A. & Alessi, D. R. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. **EMBO J.**, 24, p. 1810-1820, 2005.

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

Scheid, M. P. Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. **Nat. Ver. Mol. Cell. Biol.**, 2, p. 760-8, 2001.

Schwartz, M. W.; Figlewicz, D. P.; Baskin, D. G.; Woods, S. C. & Porte, Jr, D. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. **Endocr. Rev.**, 13, 387-414, 1992.

Schwartz, M. W.; Sipols, A. J.; Marks, J. L.; Sanacora, G.; White, J. D.; Scheurink, A. et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin.

Endocrinology, 130, p. 3608-3616, 1992.

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.

Scott, J. W.; Hawley, S. A.; Green, K. A.; Anis, M.; Stewart, G.; Scullion, G. A.; Norman, D. G. & Hardie, D. G. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. **J. Clin. Invest.**, 113, p. 274-284, 2004.

Sesti, G.; Federici, M.; Hribal, M. L.; Lauro, D.; Sbraccia, P. & Lauro, R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders, **FASEB J.**, 15, p. 2099-2111, 2001.

Shaw, R. J.; Kosmatka, M.; Bardeesy, N.; Hurley, R. L.; Witters, L. A.; DePinho, R. A.

& Cantley, L. C. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 101, p. 3329-3335, 2004.

Shaw, R. J.; Lamia, K. A.; Vasquez, D.; Koo, S. H.; Bardeesy, N.; DePinho, R. A.; Montminy, M. & Cantley, L. C. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. **Science**, 310, p. 1-11, 2005.

Shimazu, T. & Fukuda, A. Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. **Science**, 150, p. 1607-1608, 1965.

Shimazu, T. Glycogen synthetase activity in liver: regulation by the autonomic nerves. **Science**, 156, p. 1256-1257, 1967.

Shimazu, T. Innervation of the liver and glucoregulation: roles of the hypothalamus and autonomic nerves. **Nutrition**, 12, p. 65–66, 1996.

Shimazu, T. Neuronal regulation of hepatic glucose metabolism in mammals.

Diabetes Metab. Rev., 3, p. 185-206, 1987.

Shimazu, T.; Fukuda, A. & Ban, T. Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. **Nature**, 210, p. 1178–1179, 1966.

Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. J. Clin. Invest., 106, p.

171-176, 2000.

Unger, R. H. Minireview: Weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. **Endocrinology**, 144, p. 5159-5165, 2003.

Uyama, N.; Geerts, A. & Reynaert, H. Neural connections between the hypothalamus and the liver. **Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.**, 280, p. 808-20, 2004.

van Dijk, G.; Bottone, A. E.; Strubbe, J. H. & Steffens, A. B. Hormonal and metabolic effects of paraventricular hypothalamic administration of neuropeptide Y during rest and feeding. **Brain Res.**, 660, p. 96–103, 1994.

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.

Walker, K. S.; Deak, M.; Paterson, A.; Hudson, K.; Cohen, P. & Alessi, D. R. Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. **Biochem J.**, 331, p. 299-308, 1998.

Watts, L. M.; Manchem, V. P.; Leedom, T. A. et al. Reduction of Hepatic and Adipose Tissue Glucocorticoid Receptor Expression With Antisense Oligonucleotides Improves Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Diabetic Rodents Without Causing Systemic Glucocorticoid Antagonism. **Diabetes**, 54, p. 1846-1853, 2005.

White, D. W.; Kuropatwinski, K. K. & Devos, R. Leptin receptor (OB-R) signaling. J. Biol. Chem., 272, p. 4065–4071, 1997.

Woods, A.; Johnstone, S. R.; Dickerson, K.; Leiper, F. C.; Fryer, L. G.; Neumann, D.; Schlattner, U.; Wallimann, T.; Carlson, M. & Carling, D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. **Curr. Biol.**, 13, p. 2004-2008, 2003.

Xue, B. & Kahn, B. B. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. **J. Physiol.**, 574, p. 73-83. 2006. 1999.

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.

Yoshimatsu, H.; Niijima, A.; Oomura, Y.; Yamabe, K. & Katafuchi, T. Effects of hypothalamic lesion on pancreatic autonomic nerve activity in the rat. **Brain Res.**, 303, p. 147-152, 1984.

Zhou, G.; Myers, R.; Li, Y.; Chen, Y.; Shen, X.; Fenyk-Melody, J.; Wu, M.; Ventre, J.; Doebber, T.; Fujii, N.; Musi, N.; Hirshman, M. F.; Goodyear, L. J. & Moller, D. E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **J. Clin. Invest.**, 108, p. 1167-1174, 2001.

Zimmet, P.; Alberti, K. G. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, 414, p. 782-787, 2001.