Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia

**Regulação simpática de genes e enzimas chaves da
neoglicogênese em fígado de roedores expostos ao frio**

Heitor Bernardes Pereira Delfino

Ribeirão Preto
2018

HEITOR BERNARDES PEREIRA DELFINO

**Regulação simpática de genes e enzimas chaves da neoglicogênese em
fígado de roedores expostos ao frio**

(versão pró-forma/FMRP)

Dissertação de Mestrado entregue ao Departamento
de Fisiologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo –
FMRP/USP, para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho
Navegantes

Ribeirão Preto

2018

RESUMO

DELFINO, H. B. P. **Regulação simpática de genes e enzimas chaves da neoglicogênese em fígado de roedores expostos ao frio.** 2018. 99f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Embora seja bem estabelecido que a exposição a baixas temperaturas resulte em ativação simpática e hiperglicemia, os mecanismos moleculares envolvidos na regulação neural da produção hepática de glicose ainda não são bem conhecidos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel da inervação simpática na regulação de genes e enzimas chaves da neoglicogênese hepática, em roedores expostos agudamente ao frio. Para isso, foram utilizados dois modelos experimentais de desnervação simpática: a simpatectomia química em camundongos induzida pelo tratamento com 6-hidroxidopamina ($100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; 1°, 2° e 7° dia de vida pós-natal; i.p.) e a desnervação local dos nervos hepáticos por fenol (95%) em ratos.

A exposição de camundongos ao frio (4°C), durante 1, 3 e/ou 6h, induziu hiperglicemia, hipotermia, depleção do conteúdo de glicogênio hepático e ativação da neoglicogênese, estimada pela elevada expressão gênica e atividade das enzimas glicose-6-fosfatase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). Em paralelo, verificou-se que a exposição ao frio induziu um drástico aumento na expressão do RNAm do Nr4a1 e do PGC1- α , dois genes-alvos de CREB que participam do complexo de ativação transcricional dos genes que codificam as enzimas neoglicogênicas estudadas. A simpatectomia não afetou a depleção dos estoques de glicogênio hepático induzida pelo frio, mas reduziu o aumento do conteúdo hepático de noradrenalina e AMPc e acentuou a hipotermia, bem como preveniu a hiperglicemia, sendo este efeito associado ao bloqueio da expressão gênica e atividade da glicose-6-fosfatase e da PEPCK e do RNAm do Nr4a1, em todos os tempos estudados. Resultados bastante semelhantes foram observados em ratos submetidos à lesão dos nervos hepáticos com fenol e expostos ao frio durante 24h. Tanto a adrenalectomia como a adrenodemedulação (remoção da medula da adrenal) não alteraram o efeito estimulatório do frio na atividade e expressão gênica das enzimas neoglicogênicas de camundongos. Porém, em ratos expostos ao frio, a adrenodemedulação bloqueou a

hiperglicemia e reduziu parcialmente a hiperexpressão dos genes da glicose-6-fosfatase e PEPCK.

Estes resultados mostram a importância fisiológica da inervação simpática do fígado de roedores na estimulação do programa gênico da neoglicogênese, durante o estresse térmico agudo.

Palavras-chave: neoglicogênese hepática, fígado, regulação simpática, exposição ao frio.

ABSTRACT

DELFINO, H. B. P. **Sympathetic regulation of genes and key enzymes of gluconeogenesis in liver of rodents exposed to cold.** 2018. 99f. Dissertation (Masters) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Although it is well established that exposure to low temperatures leads to sympathetic activation and hyperglycemia, the molecular mechanisms related to the neural regulation of hepatic glucose production remain elusive. Therefore, the goal of the present study was to investigate the role of sympathetic innervation in the regulation of genes and key enzymes of hepatic gluconeogenesis in liver of rodents exposed to acute cold. For this, two experimental models of sympathetic denervation were used: the chemical sympathectomy in mice induced by 6-hydroxydopamine treatment ($100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$; 1°, 2° and 7° days of neonatal life; i.p.) and local denervation of hepatic nerves by phenol (95%) in rats.

Exposure of mice to cold (4°C) for 1, 3 and / or 6 h induced hyperglycemia, hypothermia, depletion of hepatic glycogen content and activation of gluconeogenesis, estimated by high gene expression and activity of the enzymes glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). In parallel, it was found that exposure to cold induced a dramatic increase in Nr4a1 and PGC1- α mRNA expression, two CREB target genes that participate in the transcriptional activation complex of the genes encoding the gluconeogenesis enzymes studied. The sympathectomy did not affect the depletion of cold-induced hepatic glycogen stores but reduced the hepatic content of noradrenaline and cAMP and increased hypothermia, as well as prevented hyperglycemia, and this effect was associated with the blockade of gene expression and enzymatic activity of glucose-6-phosphatase and PEPCK and Nr4a1 mRNA levels, at all time intervals investigated. Similar results were observed in rats submitted to hepatic nerve damage with phenol and exposed to cold for 24h. Either adrenalectomy or adrenodemedullation (surgical removal of the adrenal medulla) did not alter the stimulatory effect of cold on the activity and gene expression of the gluconeogenesis enzymes of mice. However, in cold-exposed rats, adrenodemedullation blocked hyperglycemia and partially reduced overexpression of the glucose-6-phosphatase and PEPCK mRNA.

These results show the physiological role of the hepatic sympathetic innervation in the transcriptional program associated with gluconeogenesis, during acute thermal stress.

Key-words: hepatic gluconeogenesis, liver, sympathetic regulation, cold exposure.

LISTA DE SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
ACh	Acetilcolina
ADMX	Adrenodemedulação
ADX	Adrenalectomia
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene or protein kinase B</i>
AMPC	3',5'- adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ARs	Receptores adrenérgicos
ATP	Trifosfato de adenosina
CREB	Proteína de ligação ao elemento responsivo do AMPC
DAG	1,2-diacilglicerol
DHEA	Desidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EPM	Erro padrão da média
G6pc	Gene da glicose-6-fosfatase
GR	Receptor de glicocorticoide
GREs	Elementos responsivos aos glicocorticoides
GTP	Trifosfato de guanosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenocortical
HHT	Hipotálamo-hipófise-tireoide
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
L2	Segmento lombar 2
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina
Nr4a	Membros da família de receptores nucleares órfãos do grupo A
Pck1	Gene da fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PGC1- α	Receptor de ativação proliferativa de peroxisoma gama, coativador 1 alfa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
RT-PCR	<i>Real-time reverse-transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
T1	Segmento torácico 1
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático dos componentes do sistema nervoso simpático.....	15
Figura 2. Modelo esquemático das alterações metabólicas induzidas pelo frio.....	23
Figura 3. Conteúdo de noradrenalina no fígado (ng/g) de camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3 e 6h.....	38
Figura 4. Conteúdo de AMPc no fígado (fmol/mg) de camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 6h.....	39
Figura 5. Concentração plasmática de corticosterona em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h.....	40
Figura 6. Concentração plasmática de insulina em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3 e 6h.....	41
Figura 7. Concentração plasmática de glucagon em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3 e 6h.....	42
Figura 8. Concentração plasmática de glicose em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1, 3 e 6h.....	44
Figura 9. Área sob a curva da glicemia de camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 6h.....	45
Figura 10. Conteúdo de glicogênio hepático (A) e muscular (B) em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3 e/ou 6h.....	47
Figura 11. Concentração plasmática de ácidos graxos livres em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h.....	48

Figura 12. Concentração plasmática de glicerol em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h.....	48
Figura 13. Temperatura corporal de camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 6h e a temperatura foi medida a cada vinte minutos.....	50
Figura 14. Atividade enzimática da glicose-6-fosfatase (A) e da PEPCK (B) em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3 e 6h.....	52
Figura 15. Expressão da G6pc (A) e da Pck1 (B) em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1, 3 e 6h.....	54
Figura 16. Expressão gênica de dois genes alvos de CREB: Nr4a1(A) e PGC1- α (B) em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1, 3 e 6h.....	56
Figura 17. Concentração plasmática de corticosterona em camundongos machos sham, adrenalectomizados (ADX) ou adrenodemedulados (ADMX), expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h.....	58
Figura 18. Atividade enzimática (A) e expressão gênica (B) da glicose-6-fosfatase/G6pc em camundongos machos sham ou adrenalectomizados (ADX) ou adrenodemedulados (ADMX), expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h.....	59
Figura 19. Expressão da Pck1 (A) e do PGC1- α (B) em camundongos machos sham ou adrenalectomizados (ADX) ou adrenodemedulados (ADMX), expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h.....	60
Figura 20. Concentrações plasmáticas de glicose em ratos machos, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3, 6, 12 e 24h.....	62
Figura 21. Conteúdo de glicogênio hepático (mg%) em ratos machos, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3, 6, 12 e 24h.....	63
Figura 22. Atividade enzimática da glicose-6-fosfatase em ratos machos, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3, 6, 12 e 24h.....	64

Figura 23. Conteúdo de noradrenalina no fígado (ng/g) de ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h.....	65
Figura 24. Concentração plasmática de glicose em ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle) durante 1 e 24h.....	67
Figura 25. Área sob a curva da glicemia de ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h.....	67
Figura 26. Atividade enzimática da glicose-6-fosfatase (A) e da PEPCK (B) em ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h.....	69
Figura 27. Expressão gênica da G6pc (A) e da Pck1 (B) em ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1 e 24h.....	71
Figura 28. Expressão gênica de dois genes alvos de CREB: Nr4a1(A) e PGC1- α (B) em ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1 e 24h.....	73
Figura 29. Concentrações plasmáticas de glicose em ratos machos sham, adrenodemedulados (ADMX), desnervados ou ADMX e desnervados, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1 e 24h.....	75
Figura 30. Área sob a curva da glicemia de ratos machos sham, adrenodemedulados (ADMX), desnervados ou ADMX e desnervados, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h.....	75
Figura 31. Expressão gênica da G6pc (A) e da PEPCK (B) em ratos machos sham, adrenodemedulados (ADMX), desnervados ou ADMX e desnervados, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h.....	77
Figura 32. Expressão gênica de dois genes alvos de CREB: Nr4a1(A) e PGC1- α (B) em ratos machos sham, adrenodemedulados (ADMX), desnervados ou ADMX e desnervados, expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações dos <i>primers</i> utilizados.....	35
---	----

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
1.1. Sistema Nervoso Simpático.....	14
1.2. Anatomia e fisiologia do fígado.....	16
1.3. Regulação neural da produção hepática de glicose.....	18
1.3.1. Regulação gênica da neoglicogênese.....	20
1.4. Controle do metabolismo intermediário durante a exposição ao frio	21
1.5. Métodos de desnervação simpática.....	24
1.5.1. Simpatectomia química	24
1.5.2. Desnervação hepática	25
2 – OBJETIVOS	26
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais.....	27
3.1.1. Camundongos.....	27
3.1.2. Ratos.....	27
3.2. Modelos experimentais.....	28
3.2.1. Desnervação Simpática.....	28
3.2.2. Adrenalectomia (ADX).....	29
3.3. Delineamento experimental.....	30
3.4. Conteúdo de noradrenalina hepática.....	31
3.5. Avaliação dos parâmetros metabólicos e dosagens hormonais.....	31
3.5.1. Glicogênio e Glicemia.....	32
3.5.2. AMPc.....	32
3.5.3. Ácidos graxos livres e Glicerol	32
3.5.4. Hormônios	32
3.6. Temperatura corporal	33
3.6.1. Implante do sensor	33
3.6.2. Registro da temperatura.....	33
3.7. Atividades enzimáticas	33
3.7.1. Glicose-6-fosfatase.....	33
3.7.2. Fosfoenolpiruvatocarboxiquinase (PEPCK)	34
3.8. Avaliação da expressão gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real	34
3.9. Análise estatística.....	36

4 – RESULTADOS.....	37
4.1. <i>Efeitos da simpatectomia química em camundongos expostos ao frio</i>	<i>37</i>
4.1.1. <i>Conteúdo hepático de Noradrenalina e AMPc</i>	<i>37</i>
4.1.2. <i>Parâmetros hormonais</i>	<i>40</i>
4.1.3. <i>Parâmetros metabólicos e temperatura corporal</i>	<i>43</i>
4.1.4. <i>Atividade e expressão gênica de enzimas chaves da neoglicogênese: glicose-6-fosfatase (G6pc) e fosfoenolpiruvatocarboxiquinase (Pck1)</i>	<i>51</i>
4.1.5. <i>Expressão de outros genes-alvos de CREB: Nr4a1 e PGC1-α</i>	<i>55</i>
4.2. <i>Efeito da adrenalectomia (ADX) e adrenodemedulação (ADMX) na atividade e expressão gênica de enzimas-chaves da neoglicogênese em fígado de camundongos expostos ao frio</i>	<i>57</i>
4.3. <i>Efeitos da desnervação hepática em ratos expostos ao frio.....</i>	<i>61</i>
4.3.1. <i>Caracterização do modelo experimental</i>	<i>61</i>
4.3.2. <i>Avaliação da eficiência da desnervação</i>	<i>65</i>
4.3.3. <i>Parâmetros metabólicos.....</i>	<i>66</i>
4.3.4. <i>Efeito sobre a atividade enzimática e expressão gênica de duas enzimas chave da neoglicogênese: glicose-6-fosfatase/G6pc e fosfoenolpiruvatocarboxiquinase/PEPCK....</i>	<i>68</i>
4.3.5. <i>Efeitos na expressão de outros genes-alvo de CREB: Nr4a1 e PGC1-α</i>	<i>72</i>
4.4. <i>Efeitos da adrenodemedulação (ADMX) na atividade e expressão gênica de enzimas-chaves da neoglicogênese em fígado de ratos expostos ao frio</i>	<i>74</i>
4.4.1. <i>Parâmetros metabólicos.....</i>	<i>74</i>
4.4.2. <i>Efeito sobre a expressão gênica de enzimas chave da neoglicogênese: glicose-6-fosfatase (G6pc) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Pck1)</i>	<i>76</i>
4.4.3. <i>Efeito sobre a expressão gênica de dois genes-alvo de CREB: Nr4a1 e PGC1-α....</i>	<i>78</i>
5 – DISCUSSÃO	81
6 – CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1 – INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Central (SNC) é responsável pela interação do indivíduo com o meio ambiente externo e pelo controle de todas as atividades do organismo necessárias para a manutenção da constância do meio interno, a homeostasia (UEMURA, 2015). O controle destas funções é exercido pelo *Sistema Nervoso Autônomo* (SNA), que é constituído pelo conjunto dos diferentes componentes do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e Parassimpático (SNP).

1.1. Sistema Nervoso Simpático

Nos mamíferos, o SNS ou “tóracolombar” origina-se na medula espinal intermediolateral, entre o primeiro segmento torácico (T1) e o segundo segmento lombar (L2) (LEFKOWITZ, 1975; UEMURA, 2015). Os neurônios pré-ganglionares simpáticos estão localizados em núcleos da medula espinal, e seus axônios saem da medula pelas raízes ventrais mais próximas até um gânglio paravertebral, onde fazem sinapses com os neurônios pós-ganglionares. Os axônios dos neurônios pós-ganglionares são distribuídos por meio de nervos periféricos até os órgãos efetores, tais como o fígado, coração, vasos sanguíneos, entre outros (LEFKOWITZ, 1975; UEMURA, 2015). A noradrenalina representa o principal neurotransmissor liberado pelas fibras pós-ganglionares simpáticas. Estas fibras juntamente com a porção medular da adrenal são as vias efectoras finais do SNS (figura 1).

Figura 1. Modelo esquemático dos componentes do sistema nervoso simpático (Modificada de Navegantes, L. C. C., 1998)

As glândulas adrenais estão localizadas acima dos rins, são revestidas por uma cápsula de tecido conjuntivo denso e apresentam uma região interna – *córtex*, e outra mais interna – *medula* (ELIAS et al., in: AIRES, 2012). O córtex adrenal é dividido em três zonas, sendo a zona reticular (mais interna) a produtora de andrógenos (DHEA e androstenediona), seguida da zona fasciculada (intermediária), produtora de glicocorticoides (cortisol no homem e corticosterona nos roedores), e a mais externa, zona glomerulosa, produtora de mineralocorticoides (aldosterona). A porção medular da adrenal é composta pelas células cromafins, que se assemelham estruturalmente e funcionalmente aos neurônios pós-ganglionares do SNS. Estas células são as responsáveis pela síntese e liberação das catecolaminas circulantes – *adrenalina e noradrenalina* (NAVEGANTES, in: RUI & PROCÓPIO, 2012). A adrenalina é o principal hormônio produzido pelas células cromafins, correspondendo cerca de 80% do produto secretado. As células cromafins recebem inervação simpática pré-ganglionar que atua por meio da liberação do neurotransmissor acetilcolina (Ach). A ativação da medular da adrenal é de grande relevância funcional, pois prolonga e amplifica as ações teciduais das terminações simpáticas (UEMURA, 2015).

1.2. Anatomia e fisiologia do fígado

O fígado é um órgão metabólico chave no metabolismo energético corporal que possui estreita relação funcional com outros tecidos metabolicamente ativos como o músculo esquelético, o Tecido Adiposo Marrom (TAM) e o Tecido Adiposo Branco (TAB) (RUI, 2014). Em humanos, o fígado constitui o segundo maior órgão (após a pele) e a maior glândula do organismo, com peso médio em torno de 1500g. Está localizado sob o diafragma, na parte superior direita do abdômen e se estende até o abdômen esquerdo. Morfologicamente, o fígado apresenta 4 lobos, dois maiores e dois menores, sendo que os lobos maiores são separados pela fissura umbilical na face inferior e pelo ligamento falciforme na face ântero-superior. Já a face inferior do lobo direito é delimitada pela fissura transversa ou hilar, região onde penetram os ramos da veia porta, da artéria hepática e os ductos biliares (TRIVIÑO & ABIB, 2003).

O fígado é innervado por fibras nervosas simpáticas, parassimpáticas e peptidérgicas. As fibras nervosas simpáticas são derivadas dos nervos esplâncnicos que estão conectados à medula espinal torácica (T7 e T12), e as fibras nervosas parassimpáticas são derivadas do nervo vago (MCCUSKEY, 2004; MIZUNO &

UENO, 2017). As fibras nervosas esplâncnicas, vagais e frênicas conectam-se ao fígado por meio do hílum, juntamente com a artéria hepática, com a veia porta e com o ducto biliar. Os nervos simpáticos e parassimpáticos formam dois plexos separados, mas que se comunicam entre si. O plexo anterior localizado ao redor da artéria hepática, formado por fibras nervosas com origem no gânglio celíaco e no nervo vago posterior, e o plexo posterior, que está localizado em torno da veia porta e do ducto biliar, formado por fibras do gânglio celíaco e do nervo vago direito (MIZUNO & UENO, 2017; STREBA et al., 2014). A distribuição intra-hepática das fibras nervosas que alcançam o parênquima hepático por meio destes plexos diferem de acordo com as espécies (MCCUSKEY, 2004; STREBA et al., 2014; MIZUNO & UENO, 2017). Por exemplo, em gatos, coelhos e primatas, incluindo o homem, as terminações nervosas simpáticas estabelecem conexões diretas com os hepatócitos ao longo de todo o parênquima. Por outro lado, em roedores como ratos e camundongos, as fibras nervosas intra-hepáticas estão conectadas com as células hepáticas apenas na região portal (STREBA et al., 2014; MIZUNO & UENO, 2017).

Os hepatócitos são os principais componentes funcionais do fígado e são responsáveis pelo controle dos processos de síntese, armazenamento e distribuição dos nutrientes. Desta forma, o fígado, mais do que qualquer outro órgão, contribui para a manutenção do equilíbrio metabólico do organismo. Os hepatócitos são responsáveis também pela desintoxicação, conjugação e excreção de substâncias endógenas e exógenas (PÜSCHEL, 2004).

Dentre outras funções, o fígado exerce um papel central no controle do metabolismo de aminoácidos e desintoxicação da amônia, sendo responsável pelo ciclo completo da ureia. O fígado também participa do metabolismo das purinas e proteínas e possui um papel crucial no metabolismo lipídico e de carboidratos (PÜSCHEL, 2004; YI et al., 2010), sendo todos estes processos rigorosamente regulados por fatores neurais, hormonais e nutricionais (PÜSCHEL, 2004).

1.3. Regulação neural da produção hepática de glicose

A glicose é uma importante fonte energética para todas as células dos mamíferos, e é a principal fonte energética para células como neurônios, hemácias e da medula renal. Portanto, um fornecimento constante desta hexose deve ser fornecido a fim de evitar a hipoglicemia e seus efeitos potencialmente catastróficos para o SNC (PILKIS; GRANNER, 1992). Mecanismos para a manutenção da glicemia durante um curto intervalo de tempo evoluíram para atingir estes propósitos, e envolvem um equilíbrio dinâmico entre a produção hepática de glicose (glicogenólise e neoglicogênese) e a sua captação periférica por tecidos como o músculo esquelético e o tecido adiposo (NAVEGANTES, KETTELHUT & MIGLIORINI, in: AIRES, 2012; PILKIS & GRANNER, 1992).

A primeira evidência acerca da regulação neural do metabolismo de carboidratos foi obtida em 1849 por Claude Bernard, ao demonstrar que a estimulação do quarto ventrículo cerebral em cães produzia aumento da glicosúria. Atualmente, sabe-se que o SNS modula a produção hepática de glicose por meio da ativação da glicogenólise e da neoglicogênese, e inibição da glicogênese por meio da inervação hepática direta (GARDEMANN et al., 1992; IGUCHI et al., 1989; NONOGAKI, 2000). Diversos estudos demonstraram que a estimulação elétrica de fibras simpáticas eferentes ligadas ao fígado aumenta a glicemia e a atividade enzimática da glicogênio fosforilase e da glicose-6-fosfatase no fígado de diferentes animais (JARHULT et al., 1980; PÜSCHEL, 2004; SHIMAZU et al., 1966; SHIMAZU & FUKUDA, 1965), sendo a maioria destes efeitos independente dos hormônios produzidos pelas glândulas adrenais (EDWARDS, 1971). No Brasil, os estudos pioneiros realizados pelo grupo do Dr. Migliorini, em nosso laboratório, demonstraram que a injeção de agentes colinérgicos no hipotálamo de ratos foi capaz de aumentar rapidamente a glicemia, o lactato plasmático e a incorporação de ^{14}C -bicarbonato em glicose. Estes efeitos foram bloqueados pela adrenomedulação indicando que o SNC é capaz de controlar a neoglicogênese hepática através da estimulação do SNS (BRITO et al., 1993; MIGLIORINI et al., 1989).

No fígado, as catecolaminas exercem seus efeitos pela ativação de dois tipos principais de receptores acoplados à proteína G: os adrenoceptores (ARs)- β_2 e os ARs- α_1 . O acoplamento das catecolaminas aos ARs- β_2 promove uma alteração conformacional no complexo hormônio-receptor seguida de uma interação do domínio intracelular do receptor à proteína ligadora de GTP estimulatória (Gs), levando à

dissociação das suas subunidades alfa (α) de beta-gama ($\beta\gamma$). A subunidade α fica ligada ao GTP e pode interagir e ativar a adenililciclase. A adenililciclase quando ativada pela Gs catalisa a formação de 3', 5' monofosfato cíclico (AMPc) a partir do ATP, com aumento da concentração citosólica deste segundo mensageiro. O AMPc liga-se nas subunidades regulatórias das proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA) e com isso promove a dissociação das subunidades catalíticas, que por sua vez promovem fosforilações de diferentes proteínas citosólicas e fatores de transcrição nucleares responsáveis pelos efeitos adrenérgicos finais. Entre estes efeitos, pode-se destacar o efeito clássico da PKA na fosforilação do resíduo Ser¹⁴ da glicogênio fosforilase e indução da glicogenólise (McGUINNESS et al., 1997; RALL et al., 1957). Em paralelo, a PKA promove fosforilação e inativação da glicogênio sintase, resultando em redução da glicogênese (NAVEGANTES, KETTELHUT & MIGLIORINI, in: AIRES, 2012; CIUDAD et al., 1984; HABEGGER et al., 2010; NUTTALL et al., 1988). Há evidências que a adrenalina também promova ativação da neoglicogênese hepática por meio do controle da atividade das enzimas limitantes deste processo, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose-1,6-bisfosfatase e a glicose-6-fosfatase (SHIMAZU et al., 1966; SHIOTA et al., 1995). Além dos ARs- β_2 , o fígado também contém uma população de ARs- α_1 que quando ativada desencadeia uma cascata de sinalizações intracelulares resultando em ativação da glicogenólise e neoglicogênese (CHU et al., 2000). Os receptores α_1 -adrenérgicos são acoplados à proteína Gq, que ativa a fosfolipase C, que por sua vez hidrolisa fosfolípidos de membrana, principalmente o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e do 1,2-diacylglicerol (DAG). O IP₃ age em receptores do retículo sarcoplasmático aumentando as concentrações de cálcio no citosol e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que vai fosforilar e ativar proteínas responsáveis pelos efeitos fisiológicos dependentes da ativação dos receptores α_1 -adrenérgicos (NELSON; COX, 2013).

Por outro lado, a estimulação elétrica da inervação hepática parassimpática-vagal, induz redução da glicemia, aumento da atividade enzimática da glicogênio sintase e aumento na síntese de glicogênio hepático (LAUTT; WONG, 1978; MATSUHISA et al., 2000; PÜSCHEL, 2004). Estudos mais antigos já demonstravam que a vagotomia hepática aguda reduz a síntese de glicogênio hepático após uma sobrecarga de glicose em ratos (SHIMAZU, 1967; MONDON & BURTON, 1971) e que a estimulação elétrica do nervo vago induz um aumento na atividade enzimática da glicogênio sintase e aumento na síntese de glicogênio hepático em gatos (LAUTT;

WONG, 1978). Estes achados foram confirmados em estudos com ratos submetidos à vagotomia hepática seletiva (XUE et al., 2000). Nestes animais, a síntese de glicogênio foi gravemente prejudicada após a realimentação (MATSUHISA et al., 2000; XUE et al., 2000) e a incorporação de glicose marcada no glicogênio hepático foi reduzida (MATSUHISA et al., 2000).

Embora seja bem estabelecido que a estimulação simpática seja capaz de aumentar os níveis intracelulares de AMPc e cálcio e, conseqüentemente, a produção hepática de glicose, os mecanismos moleculares envolvidos com a ação da noradrenalina na modulação da neoglicogênese hepática são pouco conhecidos.

1.3.1. Regulação gênica da neoglicogênese

Grande parte do conhecimento da regulação dos genes envolvidos com a neoglicogênese hepática está restrita à ação de hormônios pancreáticos e adrenais. Está muito bem estabelecido que o glucagon e a adrenalina estimulam o programa neoglicogênico por meio da ativação da via de sinalização do AMPc. A ativação da PKA pela molécula do AMPc promove a fosforilação da proteína ligante ao elemento responsivo de AMPc (CREB) no resíduo de Ser¹³³, que se torna ativo e se liga na região promotora de genes de enzimas chaves da neoglicogênese, como a Pck1 e a G6pc, responsáveis pela codificação da PEPCK e Glicose-6-fosfatase, respectivamente (ALTAREJOS; MONTMINY, 2011). A ativação de CREB também estimula a expressão do receptor de ativação proliferativa de peroxisoma gama, coativador 1 alfa (PGC1- α) e de membros da família de receptores nucleares órfãos do grupo A (Nr4A), da subfamília 4 (Nr4a1, Nr4a2 e Nr4a3). O PGC1- α estimula diretamente a expressão dos genes Pck1 e G6pc, sendo esta ação reforçada pela sua ação indireta na estimulação da atividade transcricional do gene Nr4a1, que sabidamente também estimula a expressão de genes neoglicogênicos (JIANG; ZHANG, 2003; ALTAREJOS; MONTMINY, 2011). Além disto, o glucagon estimula a atividade das duas enzimas chaves da neoglicogênese, a glicose-6-fosfatase e a PEPCK. A PEPCK catalisa a conversão do oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, um passo limitante na neoglicogênese hepática (JIANG; ZHANG, 2003; HABEGGER et al., 2010). Por sua vez, a glicose-6-fosfatase desfosforila a glicoquinase e com isto favorece a saída de glicose livre do hepatócito para o sangue (JIANG & ZHANG, 2003).

Os glicocorticoides também estimulam a neoglicogênese por meio do aumento da transcrição gênica da Pck1 e da G6pc. Este mecanismo ocorre por meio da ligação do glicocorticoide ao seu receptor – GR, formando um complexo binário que é translocado do citoplasma para o núcleo, onde então se liga a elementos responsivos a glicocorticoides (GREs), nas regiões promotoras da Pck1 e da G6pc, aumentando a transcrição das mesmas (JITRAPAKDEE, 2012).

Ao contrário do glucagon, sabe-se que a insulina inibe diretamente a atividade e transcrição gênica de diferentes enzimas envolvidas com a neoglicogênese, como a PEPCCK, a glicose-6-fosfatase e a frutose-1,6-difosfatase. Além disso, a insulina inativa CREB por meio da redução das concentrações citosólicas de AMPc e por meio da ativação da Akt (CROSS et al., 1995; PILKIS & GRANNER, 1992; YORK & CLAUS, 1988).

Estudos mais antigos demonstraram que a noradrenalina estimula o aumento da glicemia, da glicogenólise, da neoglicogênese e da atividade enzimática da glicose-6-fosfatase em fígados perfundidos e hepatócitos isolados de diferentes animais (EXTON; PARK, 1967; EXTON et al., 1971; DANULAT; MOMMSEN, 1990). Também foi demonstrado que estes eventos estão relacionados com o aumento nas concentrações intracelulares de AMPc (EXTON & PARK, 1967; EXTON et al., 1971; DANULAT & MOMMSEN, 1990). Porém, com o passar dos anos, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos intracelulares e o papel da noradrenalina na ativação de CREB e da neoglicogênese.

1.4. Controle do metabolismo intermediário durante a exposição ao frio

O "estresse" pode ser definido como qualquer situação de perturbação do equilíbrio entre um organismo vivo e seu meio ambiente (RANABIR & REETU, 2011). Durante uma situação de estresse, os eixos simpático-adrenalmedular, hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HHA) e hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT) são os principais sistemas de manutenção da homeostase (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009; MASLOV & VYCHUZHANOVA, 2016). Além de agir diretamente nos diferentes tecidos periféricos, sabe-se que as catecolaminas, em resposta ao estresse, levam a outras alterações hormonais como a redução das concentrações plasmáticas de insulina e aumento das concentrações plasmáticas de glucagon. O resultado de todos esses efeitos resulta no aumento do estado de alerta do indivíduo e na maior mobilização de fontes

energéticas para uma reação e/ou adaptação do mesmo a sua nova circunstância (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009).

Dentre os diferentes tipos de estresse que levam à ativação da neoglicogênese hepática, a exposição ao frio torna-se um modelo bastante interessante de ser estudado, pois a ativação dos nervos simpáticos nos diferentes tecidos metabólicos, incluindo o fígado, ocorre de forma independente da secreção das catecolaminas pela adrenal (LANDSBERG & YOUNG, 1984). Está bem estabelecido que nesta situação ocorre uma rápida elevação da taxa metabólica basal que é, em grande parte, dependente da oxidação de lipídeos e carboidratos e da síntese *de novo* de glicose pelo fígado (LANDSBERG & YOUNG, 1984; COIMBRA & MIGLIORINI, 1988). Além da redução da perda de calor induzida pelo aumento da vasoconstrição da pele (LICHTENBELT & DAANEN, 2003), sabe-se que o estresse térmico promove aumento da termogênese. Este aumento da produção endógena de calor depende da musculatura esquelética, na chamada termogênese dependente de tremor, e do TAM, tecido especializado na termogênese facultativa ou independente de tremor muscular (figura 2) (NAVEGANTES, KETTELHUT & MIGLIORINI, in: AIRES, 2012; LANDSBERG & YOUNG, 1984; MASLOV & VYCHUZHANOVA, 2016; LICHTENBELT & DAANEN, 2003). Os dois tipos facultativos de termogênese (dependente e independente do tremor) são regulados pelo SNC e utilizam como fontes principais de energia, para a produção de calor, a glicose proveniente da glicogenólise e neoglicogênese hepática e a oxidação dos ácidos graxos oriundos: 1) da hidrólise dos triacilgliceróis armazenados no próprio tecido (músculo e TAM) e 2) principalmente da hidrólise dos triacilgliceróis estocados no TAB e captados da circulação (NAVEGANTES, KETTELHUT & MIGLIORINI et al., in: AIRES, 2012; LANDSBERG & YOUNG, 1984; MASLOV & VYCHUZHANOVA, 2016; NAGAI et al., 1973). A ativação da neoglicogênese que ocorre durante a exposição a baixas temperaturas é favorecida pelo grande afluxo de aminoácidos para o tecido hepático provenientes da ativação da proteólise e redução da síntese proteica muscular (figura 2) (LANDSBERG & YOUNG, 1984; COIMBRA & MIGLIORINI, 1988). Na exposição ao frio, há também elevação da atividade do SNS do TAM, com aumento da liberação local de norepinefrina e ativação dos ARs- β_3 e hidrólise dos triacilgliceróis armazenados, o que leva à liberação dos ácidos graxos para a oxidação pelos adipócitos marrons e à produção de calor (NAVEGANTES, KETTELHUT & MIGLIORINI, in: AIRES, 2012; MORRISON et al., 2014).

Figura 2. Modelo esquemático das alterações metabólicas induzidas pelo frio (Com permissão de Navegantes, L. C. C. & Kettelhut, I. C.).

1.5. Métodos de desnervação simpática

1.5.1. Simpatectomia química

Um dos métodos de desnervação simpática mais utilizados em modelos experimentais é o do tratamento sistêmico com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma neurotoxina que inibe irreversivelmente a liberação de noradrenalina pelos terminais neurais periféricos (SACHS; JONSSON, 1975). A 6-OHDA possui ação seletiva nos nervos simpáticos, pois não acomete terminações parassimpáticas e não interfere com a liberação das catecolaminas da medular da adrenal (JONSSON, 1980; KRUKOFF; FERNANDEZ; VINCENT, 1990; BLUM et al., 2001). Além disso, provoca destruição seletiva e permanente dos gânglios simpáticos quando administrada em camundongos ou ratos neonatos (ANGELETTI; LEVI-MONTALCINI, 1970).

Diversos estudos sugerem que a especificidade da ação da 6-OHDA em neurônios simpáticos deve-se a sua analogia química com a noradrenalina, que de forma semelhante a este neurotransmissor é captada e armazenada por estes neurônios (BLUM et al., 2001; JONSSON, 1980; JONSSON & SACHS, 1970; KOSTRZEWA & JACOBOWITZ, 1974). No interior celular, a 6-OHDA pode induzir morte celular por diferentes mecanismos tóxicos que envolvem desde inibição direta da cadeia respiratória mitocondrial (BLUM et al., 2001; HEIKKILA & COHEN, 1972; JONSSON & SACHS, 1970; KOSTRZEWA & JACOBOWITZ, 1974; SACHS & JONSSON, 1975) até a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido de quinonas e radicais hidroxílicos altamente reativos (SACHS; JONSSON, 1975; BLUM et al., 2001). Estes eventos, em conjunto, induzem um grande estresse oxidativo que é amplificado pelo aumento do cálcio livre do citoplasma, com subsequente redução da capacidade antioxidante celular. Além disso, os EROs formados podem causar aumento na peroxidação de lipídeos e proteínas, ruptura da cadeia de DNA, depleção de NADH e ATP e, por fim, apoptose celular e perda irreversível de neurônios noradrenérgicos (BLUM et al., 2001; JONSSON, 1980; KOSTRZEWA & JACOBOWITZ, 1974).

1.5.2. Desnervação hepática

A inervação hepática tem sido estudada há mais de 100 anos (HOLBROOK, 1882) e em função disso a anatomia das fibras nervosas do fígado já é muito bem conhecida (MCCUSKEY, 2004; MIZUNO; UENO, 2017). O método clássico para a desnervação completa do fígado é realizado pela aplicação tópica de fenol na região próxima à artéria e a veia hepáticas (LAUTT; CARROLL, 1984; CUCCHIARO et al., 1990). O fenol é utilizado por bloquear de modo irreversível a condução nervosa em fibras mielinizadas e não mielinizadas, de acordo com a concentração que é aplicada (NATHAN & SEARS, 1960). A técnica descrita por Holmin et al., 1984, consiste na aplicação tópica de fenol (95%) nos nervos pinçados que estão próximos à artéria e a veia hepática, e esta desnervação tem duração de até 14 dias (LAUTT; CARROLL, 1984; CUCCHIARO et al., 1990).

A principal vantagem da desnervação hepática com fenol consiste na desnervação seletiva do órgão em estudo, ao contrário da simpatectomia química com 6-OHDA, que consiste em uma simpatectomia sistêmica de diversos órgãos e tecidos (CUCCHIARO et al., 1990). Por outro lado, a desnervação hepática com fenol tem a desvantagem de não ser seletiva para as fibras simpáticas hepáticas, pois também acomete as fibras parassimpáticas do fígado (CUCCHIARO et al., 1990; LAUTT & CARROLL, 1984; NATHAN & SEARS, 1960).

Baseado nestas informações utilizou-se neste trabalho o modelo de simpatectomia química com 6-OHDA e o da desnervação hepática com fenol, a fim de investigar o papel fisiológico da inervação simpática na regulação gênica da neoglicogênese em fígado de camundongos e ratos expostos ao frio.

2 – OBJETIVOS

O presente trabalho teve como **objetivo principal** investigar o papel da inervação simpática na regulação da neoglicogênese, em roedores expostos a baixas temperaturas.

Utilizando o modelo de simpatectomia química em camundongos e de desnervação hepática em ratos expostos agudamente ao frio, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- ✓ Investigar parâmetros metabólicos e hormonais relacionados com o controle do metabolismo de carboidratos e a manutenção da temperatura;
- ✓ Avaliar a atividade enzimática e expressão gênica de enzimas chaves da neoglicogênese hepática (Glicose-6-fosfatase/G6pc e PEPCK/Pck1);
- ✓ Verificar a expressão de genes alvos de CREB relacionados à ativação da neoglicogênese no fígado (Nr4a1 e PGC1- α);
- ✓ Determinar a participação dos hormônios da glândula adrenal nas alterações induzidas pelo frio na atividade e/ou expressão gênica das enzimas chaves da neoglicogênese.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle do Metabolismo dos Departamentos de Fisiologia e Bioquímica & Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) com base nos princípios de boas práticas de laboratório e procedimentos científicos, e com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP, protocolo nº 183/2015.

3.1. Animais

3.1.1. Camundongos

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem *C57/Bl6*, provenientes do Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto (PCARP). Os camundongos com idade inicial de seis semanas de vida foram mantidos em grupos de cinco em micro isoladores em rack ventilado, no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica & Imunologia da FMRP-USP. Os animais receberam dieta balanceada (NUVLAB CR1 – NUVITAL) para roedores e água *ad libitum* em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas, à temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de $\pm 55\%$. Após completarem oito semanas de vida, um grupo de casais de camundongos foi separado e acompanhado diariamente para verificação da gestação e do parto para a indução da simpatectomia química nos filhotes. Os animais simpatectomizados e controles permaneceram com as mães até o desmame.

3.1.2. Ratos

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, pesando entre 140 e 150g, provenientes do Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto (PCARP). Os animais foram mantidos em grupos de cinco por caixa, no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica & Imunologia da FMRP-USP, recebendo dieta balanceada (NUVLAB CR1 – NUVITAL) para roedores e água *ad libitum* em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas, à temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de $\pm 55\%$.

Todos os animais permaneceram nestas condições ambientais, por pelo menos 24h antes de qualquer procedimento cirúrgico.

3.2. Modelos experimentais

3.2.1. Desnervação Simpática

Os animais foram expostos ao frio, em diferentes tempos. Nestes experimentos, foram utilizados dois modelos de desnervação simpática: 1) simpatectomia química sistêmica em camundongos expostos ao frio (4°C) ou à temperatura ambiente (25°C), durante 1, 3 e 6h e 2) desnervação hepática em ratos expostos ao frio (4°C) ou à temperatura ambiente (25°C), durante 1, 3, 6, 12 e 24h.

3.2.1.1. Simpatectomia química sistêmica

Para a indução da simpatectomia química, camundongos machos *C57/Bl6* foram tratados (via intraperitoneal) com solução de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma-Aldrich) dissolvida em salina 0,9%, na dose de 100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, no primeiro (~25 µl), segundo (~25 µl) e sétimo dia (~50 µl) pós-natal (Zaglia, et al., 2013). Um grupo de animais da mesma ninhada recebeu igual volume de solução salina 0,9% no mesmo período. Os experimentos foram realizados quando os animais completaram dez semanas de idade. A simpatectomia foi comprovada por meio da determinação do conteúdo de noradrenalina no fígado.

3.2.1.2. Desnervação hepática

A desnervação hepática por fenol foi realizada de acordo com a técnica descrita por Holmin et al., (1984), em ratos machos *Wistar*. Os animais foram anestesiados com isoflurano e submetidos à tricotomia da superfície ventral da parede abdominal. Em seguida foi feita uma incisão longitudinal ampla ao longo da linha média da parede abdominal, de aproximadamente 4 cm, até as proximidades do esterno. As alças intestinais foram exteriorizadas para o lado direito e cobertas por gaze umedecida com soro fisiológico. A pele e o peritônio foram afastados para o lado esquerdo com pinças hemostáticas para ampliar a visão do campo cirúrgico. Com o auxílio de pinça oftálmica curva e uma pequena porção de algodão embebido em soro fisiológico a superfície do fígado foi pressionada no sentido rostral e mantida nesta posição. Após a localização da veia porta e da artéria hepática, as mesmas foram limpas cuidadosamente, os nervos

hepáticos foram pinçados e foi aplicado fenol (95%) com um cotonete ao longo da veia porta hepática, e com isso, os nervos foram desnaturados e necrosados. Ao final destes procedimentos, as alças intestinais foram repostas na cavidade abdominal. Em seguida, foi feita a sutura com pontos contínuos do peritônio e da pele e esterilização da ferida cirúrgica com álcool iodado. O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento, porém, os nervos foram embebidos com salina 0,9%. A eficiência da desnervação hepática foi comprovada por meio da determinação do conteúdo de noradrenalina no fígado.

3.2.1. Adrenodemedulação (ADMX)

Um grupo de camundongos e ratos foi anestesiado com isoflurano e após a tricotomia do dorso, foram feitas duas incisões paralelas à coluna vertebral, imediatamente abaixo da última costela. As glândulas adrenais, depois de visualizadas, foram pinçadas pela gordura perirenal e cortadas na extremidade superior (córtex) com o auxílio de uma pequena lâmina. Em seguida, a glândula foi suavemente pressionada para retirada somente da medular adrenal. Após a excisão da porção medular, a glândula foi devolvida à cavidade peritoneal. O animal foi suturado e o campo cirúrgico limpo com álcool iodado para evitar infecções secundárias. O grupo controle sofreu o mesmo procedimento, exceto a remoção da porção medular das glândulas adrenais.

3.2.2. Adrenalectomia (ADX)

Um grupo de camundongos foi anestesiado com a mistura de cloridrato de Xilazina e Ketamina (85 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente; i.p.), e duas incisões foram feitas paralelas à coluna vertebral imediatamente abaixo da última costela. As glândulas adrenais depois de visualizadas foram pinçadas pela gordura peri-renal e seccionadas completamente com o auxílio de uma pequena lâmina. O animal foi suturado e o campo cirúrgico limpo com álcool iodado para evitar infecções secundárias. Após este procedimento foi administrado diclofenaco na dose de 20 mg/kg, pela via intraperitoneal, em dose única. O grupo controle sofreu o mesmo procedimento, exceto a remoção das glândulas adrenais. Os animais foram mantidos com solução salina 0,9% até o dia do experimento.

3.3. Delineamento experimental

No dia anterior ao experimento, os animais foram mantidos em caixas individuais, com água e comida, e separados em 4 grupos de acordo com a espécie estudada: camundongos (Controle Salina, Controle 6-OHDA, Frio Salina e Frio 6-OHDA) e ratos (Controle Sham, Controle Desnervado, Frio Sham e Frio Desnervado). No dia do experimento, dois grupos de camundongos (Controle Salina e Controle 6-OHDA) e dois grupos de ratos (Controle Sham e Controle Desnervado) permaneceram em uma sala isolada no Laboratório de Controle do Metabolismo no Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, em temperatura ambiente de 25°C. Os outros grupos de camundongos (Frio Salina e Frio 6-OHDA) e ratos (Frio Sham e Frio Desnervado) foram mantidos(s) na câmara fria do Departamento de Fisiologia, em temperatura de 4°C, por diferentes períodos de tempo. Para evitar interferências de variáveis relacionadas ao consumo alimentar, todos os grupos permaneceram em jejum, durante todo o período experimental.

Considerando experimentos preliminares que mostraram que camundongos simpatetomizados expostos ao frio de 4°C, sem acesso ao alimento, não sobrevivem além de 8-12h, estes animais foram sacrificados após 1, 3 e/ou 6h. Um grupo separado de camundongos adultos foi submetido à ADX ou à ADMX e exposto ao frio, durante 3h.

A utilização do rato como modelo experimental possibilitou a investigação dos efeitos do frio na neoglicogênese, por um período de tempo maior do que o do camundongo. Desta forma, estes animais foram sacrificados após 1, 3, 6, 12 e/ou 24h de exposição ao frio. Um grupo separado de ratos adultos foi submetido à ADMX, à desnervação ou à dupla cirurgia (ADMX e desnervação) e exposto ao frio, durante 24h.

Após o sacrifício dos animais mantidos em temperatura ambiente ou expostos ao frio, os fígados foram rapidamente retirados, congelados com nitrogênio líquido, triturados e armazenados em freezer à temperatura de -80°C para posterior utilização. O sacrifício e a retirada dos tecidos dos animais expostos ao frio foram realizados dentro da câmara fria.

3.4. Conteúdo de noradrenalina hepática

Para determinação do conteúdo hepático de noradrenalina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado foi retirado rapidamente, congelado em nitrogênio líquido e mantido sob refrigeração a -80°C para posterior análise. Cerca de 500mg do tecido foi homogeneizado em ácido perclórico 0,2 N, contendo metabissulfito de sódio 1% EDTA 1mM e 50 mg de alumina previamente ativada em estufa a 100°C, por meia hora. Diidroxibenzilamina foi utilizada como padrão interno. As amostras foram então agitadas durante 20 minutos, centrifugadas e após aspiração do sobrenadante a alumina foi lavada repetidamente. As catecolaminas foram extraídas da alumina pela adição de solução eluidora contendo ácido perclórico (PCA) 0,10 N, sob agitação de 10 minutos (KRSTULOVIC, 1982). Alíquotas de 500 µl das amostras assim obtidas foram analisadas em um sistema de HPLC isocrático (Shimadzu, Kyoto, Japan) composto pelo autoinjeter SIL-10ADvp, pela bomba LC-10ADvp e pela controladora SCL-10Avp, acoplado a um detector eletroquímico modelo Decade (AntecLeyden, Netherlands). O software de análise foi o Class VP 6.14 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Esta análise foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia da Reprodução Feminina da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.5. Avaliação dos parâmetros metabólicos e dosagens hormonais

Para avaliar as alterações metabólicas e hormonais em nossos modelos experimentais, foram analisados a glicemia, conteúdo hepático e muscular de glicogênio, concentração plasmática de ácidos graxos livres e glicerol, assim como de hormônios como a corticosterona, insulina e glucagon.

A coleta de sangue para a determinação da glicemia foi feita por meio de uma gotícula de sangue obtida da ponta da cauda dos animais, em diferentes tempos. A coleta de sangue para determinação das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, glicerol e dos hormônios corticosterona, insulina e glucagon foi realizada após a decapitação de um grupo de animais. Para os ácidos graxos livres, glicerol e insulina, o sangue foi colocado em tubos de vidro e, após duas horas, foi centrifugado e o soro foi separado em alíquotas e armazenado em freezer à temperatura de -80°C para posterior análise. Para a corticosterona e glucagon, o sangue foi colocado em tubos heparinizados e após centrifugação, o plasma foi separado em alíquotas e armazenado em freezer à temperatura de -80°C para posterior utilização.

3.5.1. Glicogênio e Glicemia

Após o sacrifício por deslocamento cervical dos animais, o fígado e os músculos soleus e EDL foram rapidamente retirados e colocados em tubos de centrifuga contendo 2 ml de KOH 30% para a extração (SJÖRGREN et al., 1938) e determinação do conteúdo de glicogênio hepático e muscular pelo método da antrona (CARROL et al., 1956). A glicemia dos animais foi determinada pelo glicosímetro Accu-Chek®.

3.5.2. AMPc

Os conteúdos de AMPc nos fígados dos animais foi determinado por meio de um ensaio colorimétrico por meio do kit comercial Rat/Mouse cAMP ELISA Merck® (Millipore).

3.5.3. Ácidos graxos livres e Glicerol

As concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres foram determinadas por meio do kit NEFA – Randox, que é um ensaio simples e colorimétrico, com um padrão de ácido palmítico e mede quantitativamente a concentração de ácidos graxos livres (não esterificados) em várias amostras usando um formato de placa de microtitulação de 96 poços. As concentrações plasmáticas de glicerol foram determinadas por meio do kit enzimático comercial para dosagem de glicerol Bioclin da Quibasa®.

3.5.4. Hormônios

As concentrações plasmáticas de corticosterona foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio com extração prévia com álcool etílico, utilizando-se como método de separação e precipitação com carvão dextran e para a leitura coquetel de cintilação com tolueno e Antarox. Foi utilizado o kit comercial DPC – MEDLAB. As concentrações de insulina foram determinadas no soro dos animais por radioimunoensaio de fase sólida, por meio do kit comercial Rat/Mouse Insulin ELISA Merck® (Millipore). As concentrações plasmáticas de glucagon foram determinadas por meio do kit comercial de quimiluminescência Rat/Mouse Glucagon ELISA Merck® (Millipore).

3.6. Temperatura corporal

3.6.1. Implante do sensor

Camundongos foram anestesiados com isoflurano e, em seguida, foi inserido com o auxílio de uma seringa um transponder (probe metálica com um sensor térmico) na região subcutânea dorsal, próxima à cabeça do animal. O procedimento foi simples, sem a necessidade de abertura ou de pontos cirúrgicos.

3.6.2. Registro da temperatura

Para mensurar a temperatura corporal, foi utilizado o sistema de aquisição de dados BioMedic Data System DAS-6002 por meio de frequências de rádio emitidas pelos sensores (IPTT-3000, BMDS Co.). Estas frequências foram captadas pela sonda receptora (SP-6005) móvel, a identificação e a temperatura (°C) do sensor lidas apareceram no monitor do DAS-6002. A mobilidade da sonda receptora permitiu que os animais fossem mantidos em caixas individuais sem a necessidade de manipulação para leitura da temperatura. Durante o experimento, foi analisada a temperatura dos animais no tempo zero até 6h, de 20 em 20 minutos.

3.7. Atividades enzimáticas

3.7.1. Glicose-6-fosfatase

Após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, os fígados foram removidos e homogeneizados em solução contendo sacarose 0,25M na proporção de 1:3 (peso – 250 ou 500 mg: volume – 750 µl ou 1,5 ml) e centrifugados a 600g durante 10 minutos a 4°C. Após a remoção da fração gordurosa, alíquotas da solução foram obtidas para avaliação da atividade da glicose-6-fosfatase na presença de glicose-6-fosfato (0,02M em tampão maleato 0,1M pH 6,8) e as dosagens de fosfato inorgânico foram então mensuradas como parâmetro da atividade desta enzima de acordo com o protocolo descrito por Lohmann & Jendrassik (1926).

3.7.2. Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK)

Após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, os fígados foram removidos e homogeneizados em solução contendo sacarose 0,25M na proporção de 1:3 (peso – 250 ou 500 mg: volume – 750 µl ou 1,5 ml) e centrifugados a 600g durante 10 minutos a 4°C. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000g durante 50 minutos para obtenção da fração citosólica, onde foi determinada a atividade da PEPCK através da meia reação de troca de $H^{14}CO_3$ -oxaloacetato, como descrito anteriormente por Utter & Kurahashi (1955).

3.8. Avaliação da expressão gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

O RNA das amostras de fígado foi extraído pelo método do Trizol™ (Invitrogen®, EUA) e quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro (260nm). Após tratamento de 1µg de RNA total com DNase, foi adicionado o *primer* de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (20 pmoles; Invitrogen, EUA) em volume total de 11µL, sendo as misturas preparadas em água DEPC. Tão logo ao aquecimento a 70°C por 5 minutos e posterior resfriamento a 4°C, foi adicionada a transcriptase reversa e demais reagentes (tampão de reação, dNTP, água, MgCl₂ e ImProm-II™ Reverse T recombinante) e, assim, à submissão ao ciclo 25°C - 42°C e interrompida por aquecimento a 70°C por 15 minutos. Os cDNAs foram posteriormente submetidos ao PCR em tempo real utilizando-se Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen®) com sequências de *primers* específicos (tabela 1).

Tabela 1. Informações dos *primers* utilizados

Primer / Símbolo oficial	Nome oficial	Outros nomes	Sequências
G6pc	Glicose-6-fosfatase (catalítica)	G6pt; G6Pase; AW107337; Glc-6-Pase	<i>forward</i> 5'-TCT GTC CCG GAT CTA CCT TG -3' <i>reverse</i> 5'-GTA GAA TCC AAG CGC GAA AC-3'
Pck1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 (citoplasmática)	PEPCK; Pck-1; AI265463	<i>forward</i> 5'-GTG CTG GAG TGG ATG TTC GG-3' <i>reverse</i> 5'-CTG GCT GAT TCT CTG TTT TCA GG-3'
Nr4a1	Receptor nuclear da subfamília 4, grupo A, membro 1	Hmr; N10; TR3; Gfrp; Hbr1; NP10; TIS1; GFRP1; Hbr-1; NGFIB; nur77; NGFI-B; NUR77-1; NUR77-2	<i>forward</i> 5'-AGC TTG GGT GTT GAT GTT CC- 3' <i>reverse</i> 5'-AAT GCG ATT CTG CAG CTC TT- 3'
Ppargc1a / PGC1- α	Receptor de ativação proliferativa de peroxisoma gama, coativador1 alfa	Pgc1; PGC-1; Pgco1; Gm11133; Ppargc1; Pgc-1alpha; A830037N07Rik; PPARGC-1-alpha	<i>forward</i> 5'-AAT CCA GCG GTC TTA GCA CT-3' <i>reverse</i> 5'-TTT CTG TGG GTT TGG TGT GA-3'
Rpl32	Proteína ribossomal L32	AU020185; rpL32-3A	<i>forward</i> 5'-TCT GGT GAA GCC CAA GAT CG-3' <i>reverse</i> 5'-CTC TGG GTT TCC GCC AGT TT- 3'

Os resultados foram adquiridos em sistema de detecção Perkin-Elmer ABI Prism® 7500 com os seguintes parâmetros: 50°C (2 minutos), 95°C (2 minutos), 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 57°C (30 segundos), 60°C (30 segundos), seguido pelo ciclo de dissociação para verificação de um produto através de análise pela curva *melting*. Para a análise do RNAm, o nível relativo da expressão do gene foi calculado em referência à expressão da ciclofilina na amostra, utilizando-se o método do ciclo *threshold* (Ct).

3.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias percentuais $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Para análise estatística dos resultados com duas variáveis (frio e desnervação ou frio e ADMX) foi empregado o teste de análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo método de Holm-Sidak. Para os resultados com três ou mais grupos diferentes foi empregado o teste de análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido do *teste post hoc* de Newman-Keuls. Para análise estatística de dois grupos (frio e controle) ou de valores intragrupos (tempos de exposição diferentes) foi empregado o teste “*t*” de Student. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 – RESULTADOS

4.1. Efeitos da simpatectomia química em camundongos expostos ao frio

4.1.1. Conteúdo hepático de Noradrenalina e AMPc

Inicialmente, para comprovar a eficiência da simpatectomia química, foi realizada a dosagem de noradrenalina no fígado dos animais. A figura 3 apresenta os valores médios do conteúdo de noradrenalina no fígado de camundongos tratados com salina ou com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), em diferentes tempos de exposição ao frio (4°C) ou à temperatura de 25°C. O conteúdo de noradrenalina não foi aumentado no fígado de animais expostos ao frio por 3h, mas foi reduzido em 77% em fígado de animais simpatectomizados. A exposição ao frio por 6h aumentou em 150% o conteúdo hepático de noradrenalina em animais tratados com salina, sendo este efeito bloqueado em 93% pela simpatectomia (figura 3). Pode-se também observar que a simpatectomia reduziu em 63 e 78% o conteúdo de noradrenalina em fígados de animais expostos à temperatura ambiente por 3 e 6h, respectivamente (figura 3). Conforme pode ser visualizado na figura 4, o estresse térmico por 6h não aumentou o conteúdo hepático de AMPc, mas a simpatectomia causou uma pequena redução (22%) no conteúdo deste segundo mensageiro, durante este tempo de exposição.

Esses dados, em conjunto, comprovam a eficácia do tratamento com 6-OHDA em induzir simpatectomia hepática e indicam que a exposição à temperatura de 4°C por 6h aumentou a atividade simpática no fígado de camundongos sem causar, entretanto, alterações marcantes no conteúdo hepático de AMPc.

Figura 3. Conteúdo de noradrenalina no fígado (ng/g) de camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3 e 6h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina; # $p < 0,05$; em relação ao frio salina.

Figura 4. Conteúdo de AMPc no fígado (fmol/mg) de camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 6h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 4$). # $p < 0,05$; em relação ao frio salina.

4.1.2. Parâmetros hormonais

Foram determinadas as concentrações plasmáticas de corticosterona, insulina e glucagon para verificar a possível contribuição hormonal nas alterações do metabolismo de carboidratos em fígados de animais tratados com salina e 6-OHDA, expostos ao frio ou à temperatura ambiente. Foi observado que a exposição ao frio por 3h aumentou de forma semelhante às concentrações plasmáticas de corticosterona em animais controles e simpatectomizados (figura 5).

Figura 5. Concentração plasmática de corticosterona em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina; § $p < 0,05$; em relação ao controle 6-OHDA.

Como se observa na figura 6, a exposição ao frio por 6h reduziu igualmente as concentrações plasmáticas de insulina tanto em animais controles como em simpatetomizados. No tempo de 3h de exposição ao frio, não foram observadas alterações plasmáticas significativas deste hormônio.

Figura 6. Concentração plasmática de insulina em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle) durante 3 e 6h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido peloteste *post hoc* de Newman-Keuls (n = 5). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina.

A exposição ao frio por 3 e 6h não interferiu nas concentrações plasmáticas de glucagon em animais controles e simpatectomizados quando comparados aos seus respectivos controles (figura 7).

Figura 7. Concentração plasmática de glucagon em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3 e 6h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido peloteste *post hoc* de Newman-Keuls ($n = 5$).

4.1.3. Parâmetros metabólicos e temperatura corporal

A figura 8 apresenta os valores médios da concentração plasmática de glicose em animais tratados com salina ou com 6-OHDA expostos ao frio ou à temperatura ambiente, ao longo de 6h. Verifica-se que a exposição ao frio por 1, 3 e 6h induziu aumento de 40, 88 e 32%, respectivamente, na glicemia de animais tratados com salina em relação aos seus controles. A análise da área sob a curva da glicemia apresentada na figura 8 mostra que o aumento médio da glicemia induzido pelo frio, no intervalo total de 6h, foi de 40% em relação ao grupo controle.

Como se observa na figura 8 e 9, a simpatectomia bloqueou completamente a resposta de hiperglicemia induzida pelo frio em todos os tempos estudados. Em condições de termoneutralidade, os valores da concentração plasmática de glicose no grupo simpatectomizado não apresentaram diferenças significantes em relação ao grupo inervado (figuras 8 e 9).

Figura 8. Concentração plasmática de glicose em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1, 3 e 6h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak e por teste “t” de Student quando a análise foi feita intragrupo (n = 10 - 15). * p < 0,05; em relação ao controle salina; # p < 0,05; em relação ao frio salina; + p < 0,05; em relação ao tempo anterior.

Figura 9. Área sob a curva da glicemia de camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 6h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 10 - 15$). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina; # $p < 0,05$; em relação ao frio salina; § $p < 0,05$; em relação ao frio 6-OHDA.

Como se observa na figura 10A, a exposição ao frio por 3h reduziu drasticamente (80%) o conteúdo de glicogênio hepático sendo que após 6h, esta reserva energética havia sido completamente depletada em fígado de animais controles e simpatectomizados. Ao contrário do fígado, o conteúdo de glicogênio no músculo não foi alterado em animais expostos ao frio, durante 3h (figura 10B). Observou-se também um aumento de quase três vezes na concentração de AGLs no plasma de animais tratados com salina expostos ao frio e de 20% na concentração de glicerol no plasma destes animais (figura 11 e 12, respectivamente) em relação ao grupo mantido em temperatura ambiente. A simpatectomia química atenuou levemente este aumento (11%), como foi observado no grupo exposto ao frio, mas não interferiu nos valores basais de AGL (figura 11). Além disso, a simpatectomia não interferiu no efeito estimulatório do frio na concentração de glicerol plasmático, mas reduziu em 20% os valores basais de glicerol (figura 12).

A

B

Figura 10. Conteúdo de glicogênio hepático (A) e muscular (B) em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3 e/ou 6h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido do *teste post hoc* de Newman-Keuls ($n = 5$) para o glicogênio hepático (3 e 6h); e análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 5$) para o glicogênio muscular (3h). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina; § $p < 0,05$; em relação ao controle 6-OHDA.

Figura 11. Concentração plasmática de ácidos graxos livres em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina; # $p < 0,05$; em relação ao frio salina; § $p < 0,05$; em relação ao controle 6-OHDA.

Figura 12. Concentração plasmática de glicerol em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina; § $p < 0,05$; em relação ao controle 6-OHDA.

A figura 13 apresenta a curva de variação da temperatura corporal dos animais tratados com salina ou 6-OHDA expostos ao frio ou à temperatura ambiente, durante 6h. Em animais controles, o frio promoveu uma redução acentuada na temperatura corporal, que se iniciou aos 20 minutos e se estendeu até 2h40min de exposição. Em seguida, a temperatura média de $34,6 \pm 0,6$ nestes animais foi mantida abaixo dos valores controles, mas sem variação adicional até 6h de exposição ao frio. Pode-se também observar na figura 13 que a simpatectomia promoveu uma redução adicional da temperatura corporal dos animais expostos ao frio, pois a partir de 20 minutos de exposição, a temperatura corporal destes animais já era menor do que a do grupo frio salina, sendo este efeito observado até o final do experimento. Os valores da temperatura do grupo simpatectomizado não foram diferentes do grupo controle mantido em temperatura ambiente (figura 13).

Em conjunto, estes dados indicam que a exposição de camundongos a baixas temperaturas (4°C), durante até 6h, resulta em hipotermia e ativação simpática do fígado, que leva à indução de hiperglicemia por um mecanismo aparentemente independente da ativação da glicogenólise hepática e muscular.

Figura 13. Temperatura corporal de camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 6h e a temperatura foi medida a cada vinte minutos. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak e por teste “t” de Student quando a análise foi feita intragrupo (n = 5). * p < 0,05; em relação ao controle sham; # p < 0,05; em relação ao frio sham; § p < 0,05; em relação ao controle desnervado; \$ p < 0,05; em relação ao tempo anterior.

4.1.4. Atividade e expressão gênica de enzimas chaves da neoglicogênese: glicose-6-fosfatase (G6pc) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Pck1)

Como se observa na figura 14A, a exposição ao frio de animais controles por 3 e 6h induziu um aumento de 25 e 41%, respectivamente, na atividade da glicose-6-fosfatase, enzima chave da neoglicogênese. Por outro lado, a simpatectomia bloqueou o efeito estimulatório da exposição ao frio na atividade da glicose-6-fosfatase, em ambos os tempos estudados. Não foi identificada diferença significativa entre os valores da atividade da glicose-6-fosfatase dos grupos tratados com salina ou 6-OHDA mantidos em temperatura ambiente (figura 14A).

Resultados similares foram identificados para a outra enzima chave da neoglicogênese, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). Como se observa na figura 14B, a exposição ao frio induziu um aumento tempo-dependente na atividade desta enzima, em animais tratados com salina, sendo este efeito completamente bloqueado em animais simpatectomizados.

A

B

Figura 14. Atividade enzimática da glicose-6-fosfatase (A) e da PEPCK (B) em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3 e 6h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina; # $p < 0,05$; em relação ao frio salina.

A análise da expressão gênica da G6pc (glicose-6-fosfatase) em animais controles e simpatectomizados expostos ao frio apresentada na figura 15A demonstra um perfil de resposta muito semelhante ao da atividade enzimática. Pode-se observar que a exposição ao frio por 1 e 3h induziu um aumento de aproximadamente 3-4 vezes no RNAm da G6pc em fígado de animais tratados com salina em relação aos seus controles, expostos à temperatura ambiente. Este aumento induzido pelo frio foi ainda maior (~18 vezes) quando os animais foram expostos durante 6h. Verifica-se ainda que este efeito pronunciado do estresse térmico na expressão gênica da G6pc foi completamente prevenido em fígado de animais simpatectomizados (figura 15A). A simpatectomia também reduziu a expressão basal deste gene em fígado de animais mantidos em temperatura ambiente, durante 3h (figura 15A).

De forma bastante semelhante ao que foi observado na expressão gênica da G6pc, a figura 15B mostra que a exposição ao frio durante 1, 3 e 6h causou um aumento bastante expressivo (~3, 6 e 12 vezes) no RNAm da Pck1 (PEPCK), sendo este efeito também bloqueado pela simpatectomia no tempo de 1 h, e atenuado em 3 e 6h de exposição ao frio (figura 15B). Além disso, não foi identificada diferença entre os valores de expressão gênica da G6pc e da Pck1 entre os grupos tratados com salina e 6-OHDA mantidos em temperatura ambiente, nos três tempos analisados (figuras 15A e B).

Em conjunto, estes resultados indicam que a inervação simpática do fígado exerce um importante papel regulatório da atividade e expressão gênica da G6pc e Pck1 em camundongos expostos agudamente a baixas temperaturas. Além disso, pode-se concluir que a G6pc parece ser mais dependente desta regulação do que a Pck1.

A **B**

Figura 15. Expressão gênica da G6pc (A) e da Pck1 (B) em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1, 3 e 6h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 8$). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina; # $p < 0,05$; em relação ao frio salina; § $p < 0,05$; em relação ao controle 6-OHDA.

4.1.5. Expressão de outros genes-alvos de CREB: Nr4a1 e PGC1- α

Na figura 16A, pode-se observar que a exposição ao frio por 1h induziu um aumento de aproximadamente 4 vezes na expressão do RNAm do Nr4a1, um gene-alvo de CREB que participa indiretamente da ativação transcricional da G6pc e da Pck1. Houve uma forte tendência de aumento na expressão gênica do Nr4a1 em animais controles expostos ao frio por 3h, em relação aos animais expostos à temperatura ambiente (figura 16A). Também foi observado que a exposição ao frio durante 6h induziu um aumento de mais de 5 vezes na expressão deste gene quando comparado ao grupo controle salina (figura 16A). Por outro lado, como pode ser visualizada na figura 16A, a simpatectomia bloqueou o efeito estimulatório da exposição ao frio na expressão gênica do Nr4a1 por 1h, reduziu (75%) a expressão deste gene no tempo de 3h e atenuou em 54% a sua hiperexpressão induzida pela exposição ao frio de 6h.

De forma semelhante ao Nr4a1, verifica-se na figura 16B que a atividade transcricional do PGC1- α , um típico gene-alvo de CREB, foi elevada em ~2,5; 3,4 e 10 vezes, no fígado de animais expostos ao frio por 1, 3 e 6h, respectivamente. Verifica-se também na figura 16B que a simpatectomia atenuou o efeito estimulatório da exposição ao frio por 1h na expressão gênica do PGC1- α . Porém, curiosamente, a simpatectomia química exacerbou o efeito estimulatório induzido pela exposição ao frio por 3 e 6h na atividade transcricional deste gene.

Além disso, não foi identificada diferença entre os valores de expressão gênica do Nr4a1 e do PGC1- α do grupo simpatectomizado e do grupo controle mantido em temperatura ambiente, nos três tempos avaliados (figuras 16A e B).

A

B

Figura 16. Expressão gênica de dois genes alvos de CREB: Nr4a1(A) e PGC1- α (B) em camundongos machos, tratados com salina ou 6-OHDA. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1, 3 e 6h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 8$). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina; # $p < 0,05$; em relação ao frio salina; § $p < 0,05$; em relação ao controle 6-OHDA.

4.2. Efeito da adrenalectomia (ADX) e adrenodemedulação (ADMX) na atividade e expressão gênica de enzimas-chaves da neoglicogênese em fígado de camundongos expostos ao frio

Para verificar a possível participação dos hormônios da glândula adrenal (adrenalina e corticosterona) nos efeitos metabólicos induzidos pelo frio, foram utilizados animais adrenodemedulados (ADMX) e adrenalectomizados (ADX). Conforme é mostrado na figura 17, a exposição ao frio por 3h estimulou a concentração plasmática de corticosterona em animais sham e ADMX de forma semelhante. Entretanto, a adrenalectomia bloqueou completamente o efeito estimulatório da exposição ao frio nas concentrações plasmáticas de corticosterona em animais ADX, em relação ao grupo frio sham, o que comprova a eficácia da cirurgia.

Pode-se observar na figura 18 que a exposição ao frio induziu um aumento significativo na atividade enzimática e na expressão gênica da glicose-6-fosfatase/G6pc, tanto em animais sham como em animais ADX e ADMX. Um padrão similar de resposta foi observado ao se analisar a expressão gênica da Pck1 (figura 19A) e do PGC1- α (figura 19B), cujo aumento induzido pelo frio não foi prevenido pela adrenodemedulação ou pela adrenalectomia.

Portanto, estes dados sugerem que a ativação de enzimas e genes relacionados à neoglicogênese em fígado de camundongos expostos ao frio agudo não envolve a participação de hormônios como a corticosterona e a adrenalina.

Figura 17. Concentração plasmática de corticosterona em camundongos machos sham ou adrenalectomizados (ADX) ou adrenodemedulados (ADMX). Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido do *teste post hoc* de Newman-Keuls ($n = 6 - 8$). * $p < 0,05$; em relação ao controle sham; # $p < 0,05$; em relação ao frio sham.

A

B

Figura 18. Atividade enzimática (A) e expressão gênica (B) da glicose-6-fosfatase/G6pc em camundongos machos sham ou adrenalectomizados (ADX) ou adrenodemedulados (ADMX). Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido do *teste post hoc* de Newman-Keuls ($n = 8 - 12$). * $p < 0,05$; em relação ao controle sham.

A

B

Figura 19. Expressão gênica da Pck1 (A) e do PGC1- α (B) em camundongos machos sham ou adrenalectomizados (ADX) ou adrenodemedulados (ADMX). Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido do *teste post hoc* de Newman-Keuls (n = 8 - 12). * p < 0,05; em relação ao controle sham.

4.3. Efeitos da desnervação hepática em ratos expostos ao frio

4.3.1. Caracterização do modelo experimental

Para confirmar os resultados obtidos em camundongos, em um modelo animal mais resistente ao frio e que permitisse a realização de outra técnica de desnervação, foram realizados experimentos em ratos *Wistar*, submetidos à desnervação hepática por fenol. Inicialmente, foram analisados alguns parâmetros metabólicos em animais normais para definir o tempo de exposição ao frio no qual as atividades das enzimas da neoglicogênese estivessem aumentadas.

A figura 20 apresenta os valores médios da concentração plasmática de glicose em animais submetidos ao frio ou à temperatura ambiente, sem acesso ao alimento, durante 24h de experimentação. Verifica-se que, em relação ao estado basal (tempo 0), a glicemia de animais mantidos em temperatura ambiente foi mantida até 12h, seguida de uma queda significativa no tempo de 24h. Já em animais expostos ao frio, a glicemia elevou-se em 27% após 3h e depois reduziu gradativamente até o tempo de 12h, mantendo-se em um valor abaixo do basal até o final do experimento. O aumento da glicemia induzido pelo frio nos tempos de 3 e 24h foi em torno de 18-19% maior do que no grupo controle.

A

Figura 20. Concentrações plasmáticas de glicose em ratos machos. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 3, 6, 12 e 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM analisados por teste “*t*” de Student ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle; + $p < 0,05$; em relação ao tempo anterior.

Pode-se observar na figura 21 que, ao longo do tempo, o conteúdo de glicogênio hepático é gradualmente reduzido, tanto em animais mantidos em temperatura ambiente como naqueles expostos ao frio. Entretanto, esta redução é mais acentuada no grupo exposto ao estresse térmico. Estes animais apresentaram valores de glicogênio hepático menores do que os seus respectivos controles, após 3 e 6h de exposição, sendo esta redução da ordem de 26% e 71%, respectivamente. Verifica-se ainda que após 12h de experimentação, que praticamente já não existia mais glicogênio detectável no fígado de animais controles e expostos ao frio (figura 21).

Figura 21. Conteúdo de glicogênio hepático (mg%) em ratos machos. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle) durante 3, 6, 12 e 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM analisados por teste “*t*” de Student (n = 5). * $p < 0,05$; em relação ao controle; + $p < 0,05$; em relação ao tempo anterior.

Além da glicemia e do conteúdo de glicogênio hepático, avaliou-se a atividade de uma enzima chave da neoglicogênese, a glicose-6-fosfatase. Na figura 22, pode-se observar que a exposição ao frio por 3 e 6h não resultou em diferenças significativas na atividade enzimática da glicose-6-fosfatase entre o grupo exposto ao frio e o grupo mantido em temperatura ambiente. No entanto, nos tempos de 12h e 24h verificou-se um aumento significativo de 50% e 93%, respectivamente, na atividade da glicose-6-fosfatase em animais expostos ao frio, quando comparados aos animais controles.

Com base nestes resultados, definiu-se utilizar o tempo de exposição ao frio de 24h para os experimentos posteriores, uma vez que neste período se observa hiperglicemia acompanhada de depleção do glicogênio hepático e ativação enzimática da glicose-6-fosfatase.

Figura 22. Atividade enzimática da glicose-6-fosfatase em ratos machos. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle) durante 3, 6, 12 e 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM analisados por teste “t” de Student (n = 5). * p < 0,05; em relação ao controle; + p < 0,05; em relação ao tempo anterior.

4.3.2. Avaliação da eficiência da desnervação

A figura 23 apresenta os valores médios do conteúdo de noradrenalina no fígado de ratos sham ou submetidos à desnervação hepática com fenol, expostos ao frio de 4°C ou à temperatura ambiente de 25°C por 24h, sem acesso ao alimento. Pode-se observar redução de 66% no conteúdo de noradrenalina em fígados de animais desnervados e expostos à temperatura ambiente, em relação aos seus controles (figura 23). Também foi observado que a exposição ao frio por 24h aumentou em 22% o conteúdo de noradrenalina hepática em animais sham e a desnervação praticamente bloqueou este efeito (redução de 92,8%). Esses dados, em conjunto, comprovam que a desnervação química por fenol foi eficaz na indução da simpatectomia e nos permitem sugerir que o estresse térmico aumentou atividade simpática hepática em nosso modelo experimental.

Figura 23. Conteúdo de noradrenalina no fígado (ng/g) de ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle salina; # $p < 0,05$; em relação ao frio salina.

4.3.3. Parâmetros metabólicos

Pode-se observar na figura 24 que a exposição ao frio por 1, 2, 3, 6, 9 e 24h induziu aumento de 16, 24, 14, 17 e 26%, respectivamente, na glicemia de animais sham em relação aos seus controles. A análise da área sob a curva da glicemia apresentada na figura 25 mostra que o aumento médio da glicemia induzido pelo frio, no intervalo total de 24h, foi de 19% em relação ao grupo controle. A figura 24 mostra que a desnervação atenuou em 16% a resposta hiperglicêmica induzida pelo frio no tempo de 6h e bloqueou completamente o aumento da glicemia induzido pelo estresse térmico, no tempo de 9h. Entretanto, a desnervação não interferiu com a hiperglicemia observada em animais expostos ao frio no tempo de 24h. Pode-se observar pela análise da área sob a curva da glicemia que a desnervação atenuou a resposta hiperglicêmica induzida pelo frio em 7%, no intervalo total de 24h (figura 25). Em condições de termoneutralidade, os valores da concentração plasmática de glicose no grupo desnervado não apresentaram diferenças significantes em relação ao grupo innervado (figuras 24 e 25).

Figura 24. Concentração plasmática de glicose em ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), de 1 a 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak e por teste “t” de Student quando a análise foi feita intragrupo (n = 5 - 10).* p < 0,05; em relação ao controle sham; # p < 0,05; em relação ao frio sham; + p < 0,05; em relação ao tempo anterior.

Figura 25. Área sob a curva da glicemia de ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo teste de Holm-Sidak e por teste “t” de Student quando a análise foi feita intragrupo (n = 5 - 10).* p < 0,05; em relação ao controle sham; # p < 0,05; em relação ao frio sham; § p < 0,05; em relação ao controle desnervado.

4.3.4. Efeito sobre a atividade enzimática e expressão gênica de duas enzimas chave da neoglicogênese: glicose-6-fosfatase / G6pc e fosfoenolpiruvato carboxiquinase / PEPCK

Pode-se observar na figura 26A que a exposição ao frio por 24h induziu um aumento de 45% na atividade enzimática da glicose-6-fosfatase em animais sham, quando comparados a seus controles. Por outro lado, a desnervação por fenol bloqueou completamente este efeito (figura 26A). Não foi identificada diferença na atividade enzimática da glicose-6-fosfatase entre os animais desnervados e controles mantidos em temperatura ambiente (figura 26A).

Com relação à PEPCK, pode-se observar na figura 26B que a exposição ao frio por 24h induziu um aumento de duas vezes na atividade desta enzima em fígado de animais sham, em relação aos seus controles. Verifica-se também que a desnervação atenuou o efeito estimulatório do frio na atividade da PEPCK em 43% (figura 26B).

Resultados similares aos da glicose-6-fosfatase foram identificados para a PEPCK, pois também não foi identificada diferença na atividade enzimática da PEPCK entre os animais desnervados e controles mantidos em temperatura ambiente (figura 26B).

A

B

Figura 26. Atividade enzimática da glicose-6-fosfatase (A) e da PEPCK (B) em ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo método de Holm-Sidak ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle sham; # $p < 0,05$; em relação ao frio sham.

Na figura 27A, verifica-se que a exposição ao frio por 24h induziu um grande aumento de mais de 16 vezes na expressão gênica da G6pc em animais sham, em relação aos animais controles. Observa-se também nesta figura que a exposição ao frio por apenas 1h induziu um aumento de 4 vezes na expressão gênica da G6pc nos animais sham quando comparados aos seus controles mantidos em temperatura ambiente. Por outro lado, a desnervação hepática bloqueou completamente o efeito estimulatório da exposição ao frio por 1 e 24h na expressão gênica da G6pc. Além disso, não foi constatada diferença significativa na expressão gênica da G6pc entre o grupo desnervado e sham mantidos em temperatura ambiente por 1 ou 24h (figura 27A).

Pode-se observar na figura 27B que os resultados para a expressão gênica da Pck1 também acompanharam os da atividade enzimática em fígado de animais expostos ao frio ou à temperatura ambiente. A exposição ao frio por 1h induziu um aumento de 4 vezes na expressão gênica da Pck1, em relação ao grupo controle sham, sendo este efeito completamente bloqueado pela desnervação. Também foi observado que a exposição ao frio durante 24h induziu aumento de mais de 8 vezes no conteúdo de RNAm da Pck1 em animais sham em relação aos animais controles (figura 27B). Neste intervalo de tempo, a desnervação atenuou este efeito em 65% (figura 27B). Não se observou diferença na expressão gênica da Pck1 entre o grupo desnervado e sham mantidos em temperatura ambiente por 1 ou 24 h (figura 27B).

Em conjunto, estes resultados indicam que os nervos hepáticos são importantes reguladores da atividade e expressão gênica da G6pc e Pck1 em ratos expostos a baixas temperaturas. Além disso, pode-se concluir que a Glicose-6-fosfatase parece ser muito mais dependente desta regulação do que a Pck1.

A

B

Figura 27. Expressão gênica da G6pc (A) e da Pck1 (B) em ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1 e 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo método de Holm-Sidak ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle sham; # $p < 0,05$; em relação ao frio sham.

4.3.5. Efeitos na expressão de outros genes-alvo de CREB: Nr4a1 e PGC1- α

Verifica-se na figura 28A que a exposição ao frio de animais por 1 e 24h induziu um aumento de mais de 2 vezes na expressão gênica do Nr4a1, sendo que este efeito foi totalmente abolido em fígado de ratos desnervados expostos ao frio. Não houve diferença na expressão gênica do Nr4a1 entre o grupo desnervado e sham mantidos em temperatura ambiente por 1 ou 24 h (figura 28A).

A figura 28B mostra que animais expostos ao frio por 1h apresentaram um aumento de quase 7 vezes na expressão gênica do PGC1- α , em relação aos seus controles. Também se pode observar que a expressão deste gene foi 5 vezes maior em animais expostos ao frio por 24h quando comparados aos seus controles (figura 26B). Verifica-se em animais desnervados expostos ao frio por 1h uma tendência de aumento na expressão gênica do PGC1- α . Entretanto, no tempo de 24h, o efeito estimulatório do frio na expressão deste gene foi abolido pela desnervação (figura 28B). Não se verificou diferença estatística na expressão gênica do PGC1- α entre o grupo desnervado e sham, mantidos em temperatura ambiente por 1 e 24h (figura 28B).

A

B

Figura 28. Expressão gênica de dois genes alvos de CREB: Nr4a1(A) e PGC1- α (B) em ratos machos sham ou submetidos à desnervação hepática do fígado com fenol. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 1 e 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise bidirecional de variância (two-way ANOVA), seguido pelo método de Holm-Sidak ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle sham; # $p < 0,05$; em relação ao frio sham; § $p < 0,05$; em relação ao controle desnervado.

4.4. Efeitos da adrenodemedulação (ADMX) na atividade e expressão gênica de enzimas-chaves da neoglicogênese em fígado de ratos expostos ao frio

Considerando que a desnervação preveniu a hiperatividade e hiperexpressão gênica das duas enzimas chaves da neoglicogênese analisadas, mas não preveniu a hiperglicemia induzida pelo frio no tempo de 24h, investigou-se a contribuição das catecolaminas da adrenal nestas respostas. Para isso, foram utilizados animais submetidos à ADMX associada ou não à desnervação.

4.4.1. Parâmetros metabólicos

Pode-se observar na figura 29 que a exposição ao frio por 1, 2, 3, 6, 9 e 24h induziu aumento de 16, 23, 14, 17 e 24%, respectivamente, na glicemia de animais sham em relação aos seus controles. A análise da área sob a curva da glicemia apresentada na figura 28 mostra que o aumento médio da glicemia induzido pelo frio, no intervalo total de 24h, foi de 16% em relação ao grupo controle. A adrenodemedulação bloqueou completamente a resposta hiperglicêmica induzida pelo frio, durante o período de 6 às 24h. Pode-se também observar na figura 29 que a desnervação atenuou em 16% a resposta hiperglicêmica induzida pelo frio de 6h e bloqueou completamente este efeito no tempo de 9h. Curiosamente, a adrenodemedulação e a desnervação hepática juntas atenuaram em 15% a resposta hiperglicêmica induzida pelo frio somente no tempo de 6h.

A análise da área sob a curva da glicemia ao longo de todo o experimento está apresentada na figura 30 e mostra que a adrenodemedulação bloqueou totalmente a resposta hiperglicêmica induzida pelo frio, enquanto que a desnervação atenuou esta resposta apenas em 7%. Por sua vez, a curva glicêmica de animais submetidos aos dois procedimentos não foi diferente da curva controle.

Figura 29. Concentrações plasmáticas de glicose em ratos machos sham, adrenodemedulados (ADMX), desnervados ou ADMX e desnervados. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), de 1 à 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido do *teste post hoc* de Newman-Keuls ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle sham; # $p < 0,05$; em relação ao frio sham; + $p < 0,05$; em relação ao tempo anterior.

Figura 30. Área sob a curva da glicemia de ratos machos sham, adrenodemedulados (ADMX), desnervados ou ADMX e desnervados. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido do *teste post hoc* de Newman-Keuls ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle sham; # $p < 0,05$; em relação ao frio sham.

4.4.2. Efeito sobre a expressão gênica de enzimas chave da neoglicogênese: glicose-6-fosfatase (G6pc) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Pck1)

Pode-se observar na figura 31A que a exposição ao frio por 24h induziu um aumento acentuado (15 vezes) na expressão gênica da G6pc em animais sham expostos ao frio. Verifica-se também nesta figura que a ADMX atenuou este efeito em 50% (figura 31A). Por outro lado, a desnervação hepática, assim como a ADMX associada à desnervação bloquearam o efeito estimulatório do frio na expressão gênica da G6pc. Não foi identificada diferença na expressão deste gene entre os grupos ADMX e sham mantidos em temperatura ambiente (figura 31A).

A figura 31B apresenta os resultados da análise da expressão gênica da Pck1. Observa-se que a exposição ao frio de animais sham por 24h induziu um aumento de 8 vezes na expressão gênica da Pck1, sendo este efeito atenuado pela metade em animais adrenodemedulados expostos ao frio. Assim como foi observado na expressão gênica da G6pc, pode-se observar na figura 31B que o efeito estimulatório do frio na expressão gênica da Pck1 foi bloqueado tanto em animais submetidos à desnervação assim como naqueles submetidos à ADMX e à desnervação. A expressão deste gene em animais ADMX e sham mantidos em temperatura ambiente não foi diferente entre estes grupos (figura 31B).

A

B

Figura 31. Expressão gênica da G6pc (A) e da PEPCK (B) em ratos machos sham, adrenodemedulados (ADMX), desnervados ou ADMX e desnervados. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido do *teste post hoc* de Newman-Keuls ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle sham; # $p < 0,05$; em relação ao frio sham; \$ $p < 0,05$; em relação ao controle ADMX; § $p < 0,05$; em relação ao frio ADMX.

4.4.3. Efeito sobre a expressão gênica de dois genes-alvo de CREB: Nr4a1 e PGC1- α

A figura 32A mostra que a exposição ao frio por 24h induziu um aumento de 3 vezes na expressão gênica do Nr4a1 em animais sham, quando comparados a animais sham mantidos em temperatura ambiente. Pode-se também observar na figura 32A que a ADMX não alterou o perfil deste gene em fígado de animais expostos ao frio. Porém, a desnervação hepática e a ADMX associada à desnervação bloqueou o efeito estimulatório do frio na expressão gênica do Nr4a1. Não foi identificada diferença na expressão deste gene entre os grupos ADMX e sham mantidos em condições de termoneutralidade (figura 32A).

Com relação ao PGC1- α , a figura 32B mostra que a exposição ao frio por 24h induziu um aumento de 5 vezes na expressão deste gene em animais sham. Além disso, é possível observar que a ADMX, a desnervação e a ADMX associada à desnervação atenuou o efeito estimulatório do frio na expressão deste gene, em 28, 74 e 65%, respectivamente (figura 32B). Não foi identificada diferença na expressão deste gene entre os grupos mantidos em temperatura ambiente (figura 32B).

A

B

Figura 32. Expressão gênica de dois genes alvos de CREB: Nr4a1(A) e PGC1- α (B) em ratos machos sham, adrenodemedulados (ADMX), desnervados ou ADMX e desnervados. Os animais foram expostos ao frio (4°C - Frio) ou à temperatura ambiente (25°C - Controle), durante 24h. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM testados por análise unidirecional (one-way ANOVA), seguido do *teste post hoc* de Newman-Keuls ($n = 5$). * $p < 0,05$; em relação ao controle sham; # $p < 0,05$; em relação ao frio sham; \$ $p < 0,05$; em relação ao controle ADMX; § $p < 0,05$; em relação ao frio ADMX.

A análise de todos esses resultados, em conjunto, indica que tanto a inervação direta do fígado como a adrenalina proveniente da adrenal são fatores estimulatórios da expressão de genes relacionados à neoglicogênese em ratos expostos ao frio. Embora a regulação da expressão de todos os genes estudados (G6pc, Pck1, Nr4a1 e PGC1- α) seja mais dependente do componente neural, o componente hormonal parece exercer um papel mais importante na indução da hiperglicemia induzida pelo frio, em ratos.

5 – DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi investigar a importância fisiológica da inervação simpática na regulação de genes-chaves da neoglicogênese hepática em roedores expostos agudamente a baixas temperaturas. Para isso, foram utilizados dois modelos experimentais que consistiram na remoção da influência da noradrenalina endógena pela simpatectomia química (6-OHDA) em camundongos e pela desnervação hepática (fenol) em ratos. Além disso, com a utilização do modelo da adrenodemedulação e da adrenalectomia foi possível avaliar a contribuição dos hormônios da glândula adrenal (adrenalina e corticosterona) na ativação da neoglicogênese induzida pelo frio, em roedores.

A simpatectomia química com 6-OHDA foi escolhida por apresentar as vantagens de ser uma neurotoxina que inibe irreversivelmente a liberação de noradrenalina pelos terminais neurais periféricos (SACHS; JONSSON, 1975). Além disso, é uma droga de fácil aplicação e de ação seletiva nos nervos simpáticos, pois não acomete as terminações parassimpáticas e também não afeta a porção medular das adrenais (JONSSON, 1980; KRUKOFF; FERNANDEZ; VINCENT, 1990; BLUM et al., 2001). O tratamento com 6-OHDA foi realizado em neonatos por induzir uma simpatectomia permanente (ANGELETTI; LEVI-MONTALCINI, 1970), diferentemente de quando realizada em adultos, em que a simpatectomia é reversível (FINCH; THOENEN, 1973). Por outro lado, as principais desvantagens da utilização desta droga consistem na incapacidade de uma simpatectomia exclusiva do fígado, visto que, por agir de forma sistêmica, a 6-OHDA induz a simpatectomia em diferentes órgãos do animal (ANGELETTI; LEVI-MONTALCINI, 1970; KRUKOFF; FERNANDEZ; VINCENT, 1990). Além disso, neurônios noradrenérgicos centrais podem ser danificados, uma vez que a 6-OHDA tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica deneonatos (KOSTRZEWA; JACOBOWITZ, 1974; SACHS; JONSSON, 1975).

Com base nestas limitações do tratamento com 6-OHDA e na alta mortalidade dos camundongos simpatectomizados sem tempos de exposição ao frio a temperatura de 4°C acima de 7h, foi também utilizado o modelo de desnervação hepática com fenol em ratos, que sabidamente é uma espécie de roedor mais resistente ao frio. Embora este modelo apresente a grande vantagem de induzir uma desnervação localizada,

acometendo somente o fígado, apresenta a desvantagem de não ser seletivo para o SNS, visto que tanto fibras simpáticas como parassimpáticas que se ramificam juntas, próximas à artéria hepática e veia porta, são necrosadas pelo fenol (MCCUSKEY, 2004).

O presente trabalho demonstrou a importância funcional da inervação noradrenérgica na produção hepática de glicose e manutenção da glicemia durante a exposição de camundongos ao estresse térmico.

Inicialmente, a eficiência da simpatectomia química foi comprovada pela redução do conteúdo de noradrenalina no fígado de camundongos expostos à temperatura ambiente e ao frio (figura 3). Nossos experimentos mostram que a exposição aguda ao frio por 1, 3 e 6h induziu um aumento nas concentrações plasmáticas de glicose em camundongos tratados com salina (figura 8), sendo que o pico desta resposta aconteceu nas primeiras três horas do estresse térmico. O efeito hiperglicêmico observado em 1 e 3h de exposição ao frio foi provavelmente decorrente da ativação da glicogenólise e/ou redução da síntese de glicogênio, já que os estoques de glicogênio hepático foram drasticamente reduzidos nestes animais, enquanto os do músculo mantiveram-se inalterados (figuras 10A e B, respectivamente). Esta resposta catabólica não foi mediada pelo simpático uma vez que foi observada tanto em animais normais como em simpatectomizados, e foi provavelmente decorrente da ação da adrenalina circulante e/ou da menor ação da insulina, cujos níveis plasmáticos tenderam a ser reduzidos pelo frio de 3h. Nossos resultados indicam que a ativação da neoglicogênese também contribuiu para o pico hiperglicêmico induzido pelo frio, uma vez que se observou aumento da atividade enzimática e expressão gênica de duas enzimas chaves desta via metabólica: a glicose-6-fosfatase/G6pc e a PEPCK/Pck1 (figuras 14 e 15). Após 6h de exposição ao frio, houve uma atenuação da hiperglicemia que foi associada à completa depleção dos estoques de glicogênio hepático e a uma resposta ainda maior da atividade neoglicogenética, que provavelmente estava sendo mantida não apenas pela maior atividade e expressão gênica de suas enzimas chaves, mas também pelo maior fluxo de substratos neoglicogenéticos como o glicerol, aminoácidos como a alanina e lactato provenientes de processos catabólicos como a lipólise, proteólise e glicogenólise muscular, respectivamente. De fato, nossos dados estão concordantes com a literatura (GASPARETTI et al., 2003; MORRISON et al., 2014) e mostram que animais expostos ao frio por 6h apresentaram redução do glicogênio muscular e altas concentrações plasmáticas de glicerol e ácidos graxos livres.

É possível sugerir que a redução gradual do efeito hiperglicêmico induzido pelo frio ao longo do tempo possa ser explicada pelo aumento da captação e oxidação de glicose pelo músculo esquelético, um evento metabólico essencial para a manutenção da termogênese do tremor e já muito bem descrito na literatura (MARTINEAU; JACOBS, 1988; GASPARETTI et al., 2003; LICHTENBELT; DAANEN, 2003). Além do músculo, sabe-se também que o Tecido Adiposo Marrom (TAM), em situações agudas de baixas temperaturas, aumenta a captação da glicose circulante (JOST et al., 2002; ORAVA et al., 2011; WANG et al., 2015) com a finalidade de oxidá-la e dissipar a energia resultante na forma de calor por meio da ativação simpática, via β_3 -adrenorreceptores (β_3 -ARs), e da proteína de desacoplamento mitocondrial UCP-1 (MORRISON et al., 2014; LICHTENBELT & DAANEN, 2003; WANG et al., 2015). Portanto, a oferta contínua de substratos energéticos como a glicose para estes tecidos pela neoglicogênese hepática assume uma extrema importância, durante períodos mais prolongados de exposição ao frio, para garantir a manutenção da temperatura e a sobrevivência do animal. De fato, demonstrou-se pela primeira vez neste trabalho uma ativação tempo dependente da atividade e expressão gênica das enzimas chaves da neoglicogênese em camundongos expostos ao frio. Apesar disto, nossos dados mostram que os mecanismos homeotérmicos não foram suficientemente eficazes para a prevenção da hipotermia em camundongos normais expostos ao frio de 4°C, visto que estes animais apresentaram uma queda gradual na temperatura que se iniciou aos 20min e se estendeu até 2h40min de exposição ao frio, seguida de uma manutenção da temperatura média de $34,6 \pm 0,6$ até às 6h. Esta hipotermia inicial (figura 13) poderia ser explicada pela falta de ativação do TAM neste período e uma ineficiência inicial da musculatura esquelética, visto que é bem descrito na literatura que, durante a exposição aguda ao frio, há uma maior ativação da termogênese por tremor, realizada pela contração muscular (LICHTENBELT; DAANEN, 2003). É interessante observar que a manutenção da temperatura corporal desses animais no valor de $34,6 \pm 0,6$, registrada no período de 2h40min até 6h de exposição ao frio (figura 13), coincide exatamente com o fim do pico hiperglicêmico e a redução dos estoques de glicogênio muscular e possivelmente está relacionada à termogênese muscular mais eficaz e ao início da ativação do TAM. Além dos músculos esqueléticos e TAM, há evidências de que o Tecido Adiposo Branco (TAB), devido à maior ativação β_3 -adrenérgica, possa também aumentar a captação de glicose, durante a exposição ao frio, e dessa forma atenuar a resposta hiperglicêmica (GASPARETTI et al., 2003; MORENO-ALIAGA et al., 2002).

Nossos dados mostram a importância fundamental da inervação noradrenérgica do fígado na ativação gênica e da atividade de duas enzimas chaves da neoglicogênese em camundongos expostos ao frio por 6h. A simpatectomia bloqueou completamente a resposta da hiperglicemia (figura 8) e o aumento da atividade enzimática da glicose-6-fosfatase e da PEPCK (figuras 14A e B, respectivamente) induzida pelo frio em todos os tempos estudados, assim como bloqueou ou atenuou de forma acentuada o aumento da expressão gênica da G6pc e da Pck1 no fígado desses animais (figuras 15A e B, respectivamente). Estes efeitos provavelmente não foram decorrentes de alterações hormonais indiretas, visto que a secreção plasmática de glucagon permaneceu inalterada em animais expostos ao frio, assim como o aumento e redução da concentração plasmática de corticosterona e insulina, respectivamente, não foram alterados pela simpatectomia. Além disso, foi observado que a exposição ao frio por 3h induziu um aumento na atividade enzimática e/ou expressão gênica da glicose-6-fosfatase/G6pc e da PEPCK/Pck1 de forma semelhante em animais sham e adrenalectomizados ou adrenodemedulados, sugerindo que a ativação da neoglicogênese hepática em resposta ao frio agudo em camundongos é independente de glicocorticoides e da adrenalina.

A prevenção da hiperglicemia resultante do bloqueio da neoglicogênese hepática foi diretamente relacionada com a queda acentuada da temperatura corporal dos animais simpatectomizados expostos ao frio (figura 13). Conforme foi mostrado na figura 13, a simpatectomia contribuiu ainda mais para a redução da temperatura corporal dos animais expostos ao frio, pois a partir de 20 minutos de exposição, a temperatura corporal destes animais já era menor do que a do grupo frio salina, sendo este efeito observado até o final do experimento. Certamente, outros fatores, além da inativação da neoglicogênese, também contribuíram para o agravamento da hipotermia observado nos animais simpatectomizados. Como a 6-OHDA induz a simpatectomia em diferentes órgãos do animal (ANGELETTI; LEVI-MONTALCINI, 1970; KRUKOFF; FERNANDEZ; VINCENT, 1990), possivelmente a inervação noradrenérgica do TAB foi comprometida e com isso, os animais simpatectomizados expostos ao frio apresentaram uma menor concentração de AGLs plasmáticos, em relação aos animais tratados com salina e expostos ao frio, conforme é apresentado na figura 11 (RAYNER, 2001). Resultados similares foram identificados por Gilgenet al., 1962, em que ratos submetidos à simpatectomia química com reserpina e expostos ao frio apresentaram redução das concentrações plasmáticas de glicose e de AGLs e da temperatura corporal,

em relação aos seus controles. Embora a redução dos AGLs no plasma dos animais simpatectomizados tenha sido discreta (figura 11), este efeito pode ter contribuído, indiretamente, para a ausência do efeito hiperglicêmico induzido pelo frio nestes animais simpatectomizados, pois favoreceria a maior captação e utilização de glicose pela musculatura estriada esquelética para produção de calor por tremor (NAKAGAWA & NAGAI, 1971). Outra evidência encontrada que pode indicar maior captação de glicose pelo músculo dos animais simpatectomizados foi a maior redução do conteúdo de glicogênio muscular nestes animais quando comparados aos camundongos tratados com salina e expostos ao frio (figura 10B). Além disso, é bem descrito na literatura que as consequências fisiológicas da ativação simpática durante a exposição a frio abrangem tanto a produção como a conservação do calor (LANDSBERG; YOUNG, 1984). Portanto, é possível sugerir que a hipotermia dos animais simpatectomizados tenha sido também resultante da menor produção endógena de calor pelo TAM, um tecido densamente innervado por fibras simpáticas que regulam diretamente a atividade da UCP-1, assim como pelo bloqueio da vasoconstrição da pele e da pioloeração, dois mecanismos adaptativos importantes de conservação do calor em situações de baixas temperaturas (KING et al., 1999; LANDSBERG & YOUNG, 1984). É possível também que a ação termogênica dos hormônios tireoidianos tenha sido comprometida, já que a noradrenalina tem o papel de ativar a desidrase-2, convertendo o T4 em T3, no TAM (BIANCO; KIM, 2006; WILLIAMS; BASSETT, 2011; MCANINCH; BIANCO, 2014).

É bem estabelecido que grande parte das ações das catecolaminas no fígado é mediada pela ativação de ARs- β_2 , cuja via de transdução de sinal culmina com a formação do AMPc e consequente ativação de PKA/CREB e da produção hepática de glicose (LEFKOWITZ, 1975; CHU et al., 2000). Além dos ARs- β_2 , o fígado também contém uma população de ARs- α_1 que, quando ativados, elevam o conteúdo citosólico de cálcio que por sua vez desencadeia uma cascata de sinalizações intracelulares que levam à ativação da glicogenólise e neoglicogênese (CHU, et al., 2000). Uma das nossas hipóteses iniciais era que, durante a exposição ao frio, a inervação noradrenérgica direta no fígado iria promover, via ARs- β_2 , o aumento da formação de AMPc e o consequente aumento dos genes alvos da neoglicogênese. Porém, com base nos nossos achados, não se pode afirmar que a noradrenalina esteja agindo via aumento das concentrações intracelulares de AMPc, pois conforme foi mostrado na figura 4, a exposição ao frio por 6h não estimulou um aumento significativo no conteúdo hepático

deste segundo mensageiro. Resultados similares foram observados após 1h de exposição (dados não apresentados). Entretanto, verificou-se que a simpatectomia causou uma pequena, mas significativa redução no conteúdo hepático de AMPc do grupo exposto ao frio. Com base nestes resultados, é possível sugerir que, em nosso modelo experimental, a noradrenalina liberada pelos nervos simpáticos esteja atuando, preferencialmente, via $AR-\alpha_1$, o que levaria ao consequente aumento da atividade da fosfolipase C e ao aumento no conteúdo citosólico de cálcio. É sabido que o cálcio pode ativar a CaMKII e com isso promover a fosforilação de CREB (HAUS-SEUFFERT; MEISTERERNST, 2000) e dar início à expressão de genes relacionados à neoglicogênese.

Embora pouco se saiba sobre a regulação simpática de CREB, é bastante conhecido na literatura que este fator de transcrição pode estimular o programa gênico da neoglicogênese hepática em resposta ao aumento de glucagon e à redução da insulina (HAGIWARA et al., 1993; ALTAREJOS; MONTMINY, 2011). Esta ação pode ser resultante da ligação direta de CREB nas regiões promotoras dos genes responsáveis pela codificação das enzimas glicose-6-fosfatase (G6pc) e PEPCK (Pck1), ou também, pode acontecer de forma indireta, por meio da indução do gene $PGC1-\alpha$, bem como de membros da subfamília do receptor nuclear 4 grupo A da família de receptores hormonais nucleares órfãos – Nr4a (ALTAREJOS; MONTMINY, 2011). Em resposta ao jejum prolongado, por exemplo, a regulação positiva dos genes $PGC1-\alpha$ e Nr4a1 por CREB amplifica a ação do glucagon na expressão de genes neoglicogênicos como G6pc e Pck1 (ALTAREJOS; MONTMINY, 2011). Com o objetivo de analisar a participação indireta de CREB na estimulação da neoglicogênese, durante a exposição ao frio, foi analisada neste estudo a expressão do $PGC1-\alpha$ e do Nr4a1. Foi observado que a exposição ao frio induziu um aumento na expressão do RNAm destes dois genes em camundongos tratados com salina e a simpatectomia preveniu ou atenuou este efeito (figura 16). O fato do efeito estimulatório do frio por 3 e 6h nos níveis de RNAm do $PGC1-\alpha$ ter sido amplificado pela simpatectomia não pode ser explicado no presente trabalho, mas pode ser decorrente de um aumento compensatório na liberação de adrenalina nestes animais, tendo em vista que é bem descrito na literatura que este hormônio aumenta a expressão gênica do $PGC1-\alpha$ (SUTHERLAND et al., 2009). Apesar de não ter sido identificada redução na expressão deste gene em camundongos adrenalectomizados, a adrenalectomia atenuou o aumento nos níveis de RNAm do $PGC1-\alpha$ de ratos expostos ao frio por 24h (figura 32B). Por outro lado, o aumento observado na expressão deste gene pode estar relacionado a um fenômeno de

hipersensibilização caracterizado pelo aumento na densidade de receptores β -adrenérgicos induzido pelo tratamento neonatal com 6-OHDA (KAJIYAMA et al., 1982; NOMURA et al., 1980; WILLIAMS et al., 1987).

Grande parte dos resultados obtidos a partir dos experimentos realizados em camundongos simpatectomizados expostos ao frio foi confirmada com o modelo da desnervação hepática em ratos. Tendo em vista que o rato sem acesso ao alimento é um animal mais resistente ao frio, quando comparado ao camundongo, pudemos utilizá-lo para investigar os efeitos da desnervação hepática, durante períodos mais prolongados de exposição ao frio. Neste animal, foi possível identificar três fases distintas no perfil glicêmico, em resposta ao frio. As duas primeiras fases são bastante semelhantes ao do camundongo e se caracterizam por um pico hiperglicêmico que acontece nas primeiras 3h, seguido por um retorno da glicemia para valores semelhantes aos controles, durante as 9h seguintes. Após 24h, verifica-se uma terceira fase, onde a glicemia volta a aumentar acima dos valores controles.

Nossos experimentos mostraram que a exposição ao frio por 24h induziu um aumento na atividade enzimática da glicose-6-fosfatase e da PEPCK (figuras 26A e B, respectivamente), o qual foi acompanhado pela maior expressão dos genes codificadores destas enzimas (figuras 27A e B, respectivamente). Embora o perfil de ativação de todos os genes estudados tenha sido bastante semelhante nos dois modelos experimentais utilizados, é interessante observar que no rato, diferentemente do camundongo, a atividade enzimática da glicose-6-fosfatase está aumentada mais tardiamente, durante a exposição ao frio. Enquanto que no camundongo, esta atividade já se encontra aumentada após 3h de exposição, no rato, observa-se efeito semelhante somente após 12h. Este aumento coincide temporalmente com a depleção dos estoques de glicogênio hepático, os quais foram gradualmente reduzidos ao longo do tempo de exposição ao frio. Portanto, é possível sugerir que a glicogenólise e/ou redução da síntese do glicogênio hepático são as vias metabólicas responsáveis pelo pico hiperglicêmico inicial induzido pelo frio em ratos, enquanto que a neoglicogênese seria mais importante para a hiperglicemia observada em tempos mais prolongados, ou seja, após 24h de exposição.

De forma semelhante ao modelo da simpatectomia, nossos resultados mostram que a desnervação hepática de ratos bloqueou ou atenuou todos os efeitos estimulatórios da exposição ao frio na atividade enzimática e expressão gênica da glicose-6-fosfatase e da PEPCK (figuras 26A e B, 27A e B, respectivamente). Apesar da desnervação

hepática com fenol lesar todos os tipos de fibras nervosas que chegam ao fígado, incluindo as simpáticas e parassimpáticas, é razoável supor que a perda da inervação simpática tenha sido o mecanismo responsável pela inativação dos genes e enzimas chaves da neoglicogênese. Embora os mecanismos moleculares não sejam bem compreendidos, há muito tempo se sabe que a estimulação elétrica do nervo esplâncnico induz aumento da glicemia em coelhos (SHIMAZU; FUKUDA, 1965), gatos (JARHULT et al., 1980), cães (PÜSCHEL, 2004) e humanos (JARHULT et al., 1979). Ao contrário do simpático, diversas evidências na literatura indicam que o papel regulatório do sistema nervoso parassimpático no metabolismo dos carboidratos no fígado é anabólico (MATSUHISA et al., 2000; PÜSCHEL, 2004; JARHULT et al., 1978). Em um estudo realizado por Lutt & Wong, 1978, foi observado que a estimulação elétrica dos nervos hepáticos após a destruição seletiva de fibras simpáticas resultou em uma diminuição nos níveis de glicemia em gatos. Em um outro estudo (PÜSCHEL, 2004), foi observado que a estimulação elétrica do nervo vago induziu um aumento na atividade enzimática da glicogênio sintase e aumento na síntese de glicogênio hepático em coelhos. Estes mesmos efeitos foram observados em ratos (MATSUHISA et al., 2000). Shimazu, 1967, mostrou que a estimulação do nervo vago em coelhos intactos ou pancreatectomizados resultou em um aumento rápido e acentuado da atividade da glicogênio sintase, no fígado. Portanto, com base nestas evidências e em nossos resultados, podemos sugerir que a inervação simpática do fígado de ratos é essencial na ativação de genes e enzimas específicas da neoglicogênese, em situações de baixas temperaturas. Entretanto, é possível que outros fatores, além da inervação direta do fígado, também devem estar participando do controle da resposta hiperglicêmica ao estresse térmico no sentido de amplificar a ação estimulatória do nervo simpático na expressão de genes-alvos de CREB (Nr4a1, PGC1- α , Pck1 e G6pc).

Com o objetivo de investigar o papel da adrenalina circulante na ativação do programa gênico da neoglicogênese e manutenção da glicemia no modelo experimental em ratos, foram comparados animais com cirurgia fictícia a animais submetidos à adrenodemedulação, desnervação hepática ou submetidos à dupla cirurgia (adrenodemedulação e desnervação).

Nossos experimentos mostraram o papel crucial da adrenalina na manutenção da glicemia durante a exposição ao frio. Verificou-se que a remoção da medular adrenal aboliu completamente a hiperglicemia induzida pelo frio, em ratos, em todos os tempos estudados. Por outro lado, a desnervação hepática possui um papel menos importante na

manutenção da glicemia, pois foi identificada atenuação do efeito hiperglicêmico do frio em 6h e um bloqueio deste efeito somente em 9h de exposição. Curiosamente, ao contrário do tempo de 6h, a dupla desnervação não interferiu com o aumento da glicemia em ratos expostos ao frio. Possíveis mecanismos compensatórios, como aumento na liberação de glicocorticoides e/ou glucagon, foram desenvolvidos nestes animais. A incapacidade de manutenção da hiperglicemia observada nos animais adrenodemedulados expostos ao frio, está possivelmente relacionada com a redução da ação lipolítica, glicogenolítica (hepática e muscular) e lactocidêmica mediada pela adrenalina circulante. Sabidamente, todas essas ações adrenérgicas contribuem direta ou indiretamente para o aumento da glicemia induzida pelo estresse agudo. Além disso, a adrenalina pode estimular a neoglicogênese hepática em ratos. Brito et al., 1993 demonstraram que a injeção de agentes colinérgicos no núcleo ventromedial do hipotálamo induziu rápida hiperglicemia, hiperlactacidemia e ativação da neoglicogênese em ratos alimentados e conscientes, sendo estes efeitos supressos pela adrenodemedulação. Por outro lado, em um estudo realizado por Jarhult, 1975, a adrenalectomia e a desnervação hepática separadas não reduziram o efeito hiperglicêmico induzido pela hemorragia, em ratos. Porém, a resposta hiperglicêmica induzida pela hemorragia foi abolida pela combinação da adrenalectomia com a desnervação hepática (JARHULT, 1975).

Nossos resultados mostram que a inervação hepática assume um papel modulatório mais importante do que a adrenalina na regulação da atividade transcricional dos genes alvos de CREB, durante a exposição ao frio. De fato, como pode ser visualizado nas figuras 31A e B, verificou-se que enquanto a adrenodemedulação atenuou em aproximadamente 50% o efeito estimulatório da exposição ao frio por 24h na expressão gênica da *G6pc* e da *Pck1*, a desnervação, associada ou não à adrenodemedulação, bloqueou completamente este efeito. Além disso, a adrenodemedulação não interferiu no efeito estimulatório do frio na expressão do RNAm do *Nr4a1*, enquanto a desnervação e a dupla desnervação bloquearam este efeito (figura 32A). Observou-se também que o efeito supressor da adrenodemedulação na indução da expressão gênica do *PGC1- α* em ratos expostos ao frio é bem menor quando comparado ao da desnervação e da desnervação associada à adrenodemedulação (figura 32B). Estes resultados estão de acordo com os estudos de atividade enzimática realizados por Nagai & Nakagawa, em 1973. Neste trabalho, demonstrou-se que a adrenodemedulação, adrenalectomia ou tireoidectomia não impediram o efeito

estimulatório da exposição ao frio por 6h na atividade enzimática da PEPCK. Por outro lado, quando a atividade simpática destes animais foi bloqueada com reserpina, o efeito estimulatório do frio na atividade enzimática da PEPCK foi supresso (NAGAI & NAKAGAWA, 1973).

A análise de todos esses resultados, em conjunto, indica que tanto a inervação direta do fígado como a adrenalina proveniente da adrenal são fatores estimulatórios da expressão de genes relacionados à neoglicogênese em ratos expostos ao frio. Embora a regulação da expressão de todos os genes alvos de CREB estudados (G6Ppc, Pck1, Nr4a1 e PGC1- α) seja mais dependente do componente neural, o componente hormonal parece exercer um papel mais importante na indução da hiperglicemia induzida pelo frio, em ratos.

É interessante constatar que a hiperglicemia assim como o controle gênico da neoglicogênese no camundongo, diferentemente do rato, parece ser totalmente dependente da inervação direta, uma vez que os efeitos estimulatórios induzidos pelo frio de até 6h, tanto na glicemia, como na expressão de genes alvos de CREB e na atividade enzimática da glicose-6-fosfatase foram abolidos pela simpatectomia, mas não foram modulados pela adrenodemedulação e nem pela adrenalectomia. Isto nos sugere que a ativação da neoglicogênese hepática em resposta ao frio agudo em camundongos é independente de hormônios como a adrenalina e os glicocorticoides.

6 – CONCLUSÕES

1 – As alterações do metabolismo de carboidratos em camundongos expostos ao frio por até 6h caracterizam-se por hiperglicemia associada à ativação de genes e enzimas chaves da neoglicogênese e depleção completa e parcial dos estoques de glicogênio hepático e muscular, respectivamente. Estes animais apresentam aumento do conteúdo hepático de noradrenalina, aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona e redução das concentrações plasmáticas de insulina, sem alterações aparentes das concentrações plasmáticas de glucagon;

2 – A depleção dos estoques de glicogênio hepático/muscular em roedores expostos ao frio não depende da inervação noradrenérgica hepática;

3 – O SNS é essencial para o controle da temperatura corporal de camundongos expostos agudamente ao frio e para a indução da hiperglicemia e ativação de enzimas chaves da neoglicogênese;

4 – A ativação da neoglicogênese hepática em camundongos expostos ao frio não parece ser dependente dos hormônios da glândula adrenal;

5 – Embora a adrenalina seja um hormônio fundamental para o aumento da glicemia induzida pelo frio de 24h em ratos, este hormônio ativa parcialmente (em torno de 50%) a expressão de genes da neoglicogênese;

6 – O componente da inervação noradrenérgica do fígado de roedores exposto ao frio exerce um papel preponderante na ativação de genes alvos de CREB envolvidos no controle da neoglicogênese. A importância fisiológica da regulação simpática de genes e enzimas chaves da neoglicogênese em situações de baixas temperaturas consiste na necessidade de manutenção da oferta absoluta de glicose para o SNC e para o fornecimento de substrato energético para tecidos responsáveis pela produção de calor, como o músculo esquelético e o tecido adiposo marrom, funções estas essenciais para a sobrevivência do animal.

Futuros estudos deverão esclarecer os receptores, vias de sinalizações e fatores transcripcionais (CREB) envolvidos nesta ação adrenérgica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTAREJOS, J. Y.; MONTMINY, M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 3, p. 141–151, 2011.

ANGELETTI, P. U.; LEVI-MONTALCINI, R. Sympathetic nerve cell destruction in newborn mammals by 6-hydroxydopamine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 65, n. 1, p. 114–21, 1970.

BIANCO, A.; KIM, B. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 10, p. 2571–2579, 2006.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M. F.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 2, p. 135–172, 2001.

BRITO, N. A.; BRITO, M. N.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Intra-ventromedial hypothalamic injection of cholinergic agents induces rapid hyperglycemia, hyperlactatemia and gluconeogenesis activation in fed, conscious rats. **Brain Research**, v. 626, n. 1–2, p. 339–342, 1993.

CHU, C. a; SINDELAR, D. K.; IGAWA, K.; SHERCK, S.; NEAL, D. W.; EMSHWILLER, M.; CHERRINGTON, a D. The direct effects of catecholamines on hepatic glucose production occur via $\alpha 1$ - and $\beta 2$ -receptors in the dog. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, n. 2, p. E463–E473, 2000.

CIUDAD, C.; CAMICI, M.; AHMAD, Z.; WANG, Y.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; ROACH, P. J. Control of glycogen synthase phosphorylation in isolated rat hepatocytes by epinephrine, vasopressin and glucagon. **European Journal of Biochemistry**, v. 142, n. 3, p. 511–520, 1984.

CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785–789, 1995.

CUCCHIARO, G.; YAMAGUCHI, Y.; MILLS, E.; KUHN, C. M.; ANTHONY, D. C.; BRANUM, G. D.; EPSTEIN, R.; MEYERS, W. C. Evaluation of selective liver denervation methods. **The American journal of physiology**, v. 259, n. 5 Pt 1, p. G781–5, 1990.

DANULAT, E.; MOMMSEN, T. P. Norepinephrine: A potent activator of glycogenolysis and gluconeogenesis in rockfish hepatocytes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 78, n. 1, p. 12–22, 1990.

EDWARDS, B. Y. A. V. The glycogenolytic response to stimulation of the splanchnic nerves in adrenalectomized calvez, sheep dogs, cats and pigs. **J. Physiol**, p. 741–759, 1971.

ELIAS, L. L. K.; FERNANDES-ROSA, F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; DE-CASTRO, M. Glândula adrenal. In: **Fisiologia**. AIRES, M. de M. 4ª ed. 2012. cap. 69, p. 1180-1193.

EXTON, J. H.; A, R. G.; SUTHERLAND, E. W.; PARK, C. R. Studies hepatic on the role actions of adenosine 3',5'-monophosphate in the hepatic actions of glucagon and catecholamines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 20, p. 6166–6177, 1971.

EXTON, J. H.; PARK, C. R. Control of Gluconeogenesis in Liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 11, p. 2622–2636, 1967.

FINCH, L.; THOENEN, H. A comparison of the effects of chemical sympathectomy by 6-hydroxydopamine in newborn and adult rats. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 47, p. 249–260, 1973.

GARDEMANN, A.; PÜSCHEL, G. P.; JUNGGERMANN, K. Nervous control of liver metabolism and hemodynamics. **European Journal of Biochemistry**, v. 207, n. 2, p. 399–411, 1992.

GASPARETTI, A. L.; DE SOUZA, C. T.; PEREIRA-DA-SILVA, M.; OLIVEIRA, R. L. G. S.; SAAD, M. J. A.; CARNEIRO, E. M.; VELLOSO, L. A. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. **The Journal of physiology**, v. 552, n. Pt 1, p. 149–62, 2003.

HABEGGER, K. M.; HEPPNER, K. M.; GEARY, N.; BARTNESS, T. J.; DIMARCHI, R.; TSCHÖP, M. H. The metabolic actions of glucagon revisited. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 6, n. 12, p. 689–697, 2010.

HAGIWARA, M.; BRINDLE, P.; HAROOTUNIAN, A.; ARMSTRONG, R.; RIVIER, J.; VALE, W.; TSIEN, R.; MONTMINY, M. R. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 8, p. 4852–9, 1993.

HAUS-SEUFFERT, P.; MEISTERERNST, M. Mechanisms of transcriptional activation of cAMP-responsive element-binding protein CREB. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 212, n. 1–2, p. 5–9, 2000.

HEIKKILA, R.; COHEN, G. Further Studies on the Generation of Hydrogen Peroxide by 6-Hydroxydopamine. **Molecular Pharmacology**, p. 241–248, 1972.

HOLBROOK, M. L. The termination of the nerves in the liver. **Proceedings of the American Society of Microscopists**, v. 4, n. 1, p. 95–100, 1882.

IGUCHI, A.; KUNOH, Y.; MIURA, H.; UEMURA, K.; YATOMI, A.; TAMAGAWA, T.; SAKAMOTO, N.; KAWAHARA, H. Central Nervous System Control of Glycogenolysis and Gluconeogenesis and Fasted Rat Liver. **Metabolism**, v. 38, n. 12, p. 1216–1221, 1989.

JARHULT, J.; ANDERSSON, P O; HOLST, J; MOGHIMZADEH, E; NOBIN, A. On the sympathetic innervation to the cat's liver and its role for hepatic glucose release. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 110, n. 1, p. 5–11, 1980.

JARHULT, J.; FALCK, B.; INGEMANSSON, S.; NOBIN, A. **The functional importance of sympathetic nerves to the liver and endocrine pancreas** *Annals of surgery*, 1979. .

JIANG, G.; ZHANG, B. B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 284, n. 4, p. E671–E678, 2003.

JITRAPAKDEE, S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 1, p. 33–45, 2012.

JONSSON, G. Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. **Annual review of neuroscience**, v. 3, p. 169–187, 1980.

JONSSON, G.; SACHS, C. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 141–155, 1970.

JOST, P.; FASSHAUER, M.; KAHN, C. R.; BENITO, M.; MEYER, M.; OTT, V.; LOWELL, B. B.; KLEIN, H. H.; KLEIN, J. Atypical β -adrenergic effects on insulin signaling and action in β 3-adrenoceptor-deficient brown adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 0193–1849 (Print), p. E146–E153, 2002.

KAJIYAMA, H.; OBARA, K.; N, Y.; SEGAWA, T. The increase of cardiac β 1-subtype of β -adrenergic receptors in adult rats following neonatal 6-hydroxydopa treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 75–77, 1982.

KING, V. L.; DWOSKIN, L. P.; CASSIS, L. A. Cold exposure regulates the norepinephrine uptake transporter in rat brown adipose tissue. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 1 Pt 2, p. R143-51, 1999.

KOSTRZEWA, R. M.; JACOBOWITZ, D. M. Pharmacological Actions of 6-Hydroxydopamine. **Pharmacological Reviews**, v. 26, n. 3, p. 199–288, 1974.

KRUKOFF, T. L.; FERNANDEZ, M. C.; VINCENT, D. H. Effects of neonatal sympathectomy with 6-hydroxydopamine or guanethidine on survival of neurons in the intermediolateral cell column of rat spinal cord. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 31, n. 2, p. 119–126, 1990.

LANDSBERG, L.; YOUNG, J. B. The role of the Sympathoadrenal System in Modulating Energy Expenditure. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 3, p. 475–499, 1984.

- LAUTT, W. W.; CARROLL, a M. Evaluation of topical phenol as a means of producing autonomic denervation of the liver. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 62, n. 7, p. 849–53, 1984.
- LAUTT, W. W.; WONG, C. Hepatic parasympathetic neural effect on glucose balance in the intact liver. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, p. 679–682, 1978.
- LEFKOWITZ, J. Heterogeneity of adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 583–590, 1975.
- LICHTENBELT, W. D. van M.; DAANEN, H. A. M. Cold-induced metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, n. 4, p. 469–475, 2003.
- MARTINEAU, L.; JACOBS, I. Muscle glycogen utilization during shivering thermogenesis in humans. **Journal of applied physiology**, v. 65, n. 5, p. 2046–50, 1988.
- MASLOV, L. N.; VYCHUZHANOVA, E. A. The Role of the Sympathoadrenal System in Adaptation to Cold. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 46, n. 5, p. 589–600, 2016.
- MATSUHISA, M.; YAMASAKI, Y.; SHIBA, Y.; NAKAHARA, I.; KURODA, A.; TOMITA, T.; IKEDA, M.; KAJIMOTO, Y.; KUBOTA, M.; HORI, M. Important role of the hepatic vagus nerve in glucose uptake and production by the liver. **Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 11–16, 2000.
- MCANINCH, E. A.; BIANCO, A. C. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1311, n. 1, p. 77–87, 2014.
- MCCUSKEY, R. S. Anatomy of efferent hepatic nerves. **Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 280, n. 1, p. 821–826, 2004.
- MCGUINNESS, O. P.; SHAU, V.; BENSON, E. M.; LEWIS, M.; SNOWDEN, R. T.; GREENE, J. E.; NEAL, D. W.; CHERRINGTON, A. D. Role of epinephrine and norepinephrine in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 273, n. 4, p. E674–E681, 1997.
- MIGLIORINI, R. H.; GAROFALO, M. A.; ROSELINO, J. E.; KETTELHUT, I. C. Rapid activation of gluconeogenesis after intracerebroventricular carbachol. **The American journal of physiology**, v. 257, n. 4 Pt 1, p. E486-90, 1989.
- MIZUNO, K.; UENO, Y. Autonomic Nervous System and the Liver. **Hepatology Research**, v. 47, n. 2, p. 160–165, 2017.

MORENO-ALIAGA, M. J.; LAMAS, O.; MARTI, A.; MARTINEZ, J. A. Effects of a β 3-adrenergic agonist on glucose uptake and leptin expression and secretion in cultured adipocytes from lean and overweight (cafeteria) rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 291, n. 5, p. 1201–1207, 2002.

MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J.; TUPONE, D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 741–756, 2014.

NAGAI, KATSUYA & NAKAGAWA, H. Cold adaptation. **Journal Biochemistry**, v. 74, p. 873–879, 1973.

NAKAGAWA, HACHIRO & NAGAI, K. Effect of Cold-exposure in Gluconeogenesis. **J. Biochem.**, v. 69, n. 5, p. 923–934, 1971.

NATHAN, P. W.; SEARS, T. A. Effects of phenol on nervous conduction. **The Journal of physiology**, v. 150, p. 565–80, 1960.

NAVEGANTES, L. C. C. **Controle do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de rato pelo sistema nervoso simpático**. 1998. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

NAVEGANTES, L. C. C. Funções dos hormônios das adrenais. In: **Fisiologia Básica**. RUI, C. & PROCÓPIO, J. 1ª ed. 2009. cap. 51, p. 733-750.

NAVEGANTES, L. C. C.; KETTELHUT, I. C. & MIGLIORINI, R. H. Controle hormonal e neural do metabolismo energético. In: **Fisiologia**. AIRES, M. de M. 4ª ed. 2012. cap. 74, p. 1168-1178.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª edição ed. [s.l: s.n.]

NOMURA, Y.; KAJIYAMA, H.; SEGAWA, T. Hypersensitivity of cardiac β -adrenergic receptors after neonatal treatment of rats with 6-hydroxydopa. **European Journal of Pharmacology**, v. 66, p. 225–232, 1980.

NONOGAKI, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. **Diabetologia**, v. 43, n. 5, p. 533–549, 2000.

NUTTALL, F. Q.; GILBOE, D. P.; GANNON, M. C.; NIEWOEHRNER, C. B.; TAN, A. W. H. Regulation of glycogen synthesis in the liver. **The American Journal of Medicine**, v. 85, n. 5 SUPPL. 1, p. 77–85, 1988.

ORAVA, J.; NUUTILA, P.; LIDELL, M. E.; OIKONEN, V.; NOPONEN, T.; VILJANEN, T.; SCHEININ, M.; TAITTONEN, M.; NIEMI, T.; ENERBÄCK, S.; VIRTANEN, K. A. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 272–279, 2011.

- PILKIS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular Physiology of the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. **Annual Review of Physiology**, v. 54, n. 1, p. 885–909, 1992.
- PILKIS, S. K.; EL-MAHRABI, M. R.; CLAUS, T. H. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 755–783, 1988.
- PÜSCHEL, G. P. Control of hepatocyte metabolism by sympathetic and parasympathetic hepatic nerves. **Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 280, n. 1, p. 854–867, 2004.
- RALL, T. W.; SUTHERLAND, E. W.; BERTHET, J. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase: IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. **J. Biol. Chem.**, n. 224, p. 463–475, 1957.
- RANABIR, S.; REETU, K. Stress and hormones. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 18, 2011.
- RAYNER, D. V. The sympathetic nervous system in white adipose tissue regulation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 3, p. 357–364, 2001.
- RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. **Compr Physiol**, v. 4, n. 1, p. 177–197, 2014.
- SACHS, C.; JONSSON, G. Mechanisms of action of 6-OHDA. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, p. 1–8, 1975.
- SHIMAZU, T. Glycogen Synthetase Activity in Liver: Regulation by the Autonomic Nerves. **Science**, v. 156, n. 779, p. 1256–1257, 1967.
- SHIMAZU, T.; FUKUDA, A. Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. **Science**, v. 150, n. 703, p. 1607–1608, 1965.
- SHIMAZU, T.; FUKUDA, A.; BAN, T. Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. **Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 65–66, 1996.
- SHIOTA, M.; INAGAMI, M.; FUJIMOTO, Y.; MORIYAMA, M.; KIMURA, K.; SUGANO, T. Cold acclimation induces zonal heterogeneity in gluconeogenic responses to glucagon in rat liver lobule. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 268, n. 6 31-6, p. 1184–1191, 1995.
- STREBA, L. A. M.; VERE, C. C.; IONESCU, A. G.; STREBA, C. T.; ROGOVEANU, I. Role of intrahepatic innervation in regulating the activity of liver cells. **World Journal of Hepatology**, v. 6, n. 3, p. 137–143, 2014.
- SUTHERLAND, L. N.; BOMHOF, M. R.; CAPOZZI, L. C.; BASARABA, S. A. U.; WRIGHT, D. C. Exercise and adrenaline increase PGC-1 α mRNA expression in rat adipose tissue. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 7, p. 1607–1617, 2009.

- TRIVIÑO, T.; ABIB, S. D. C. V. Anatomia cirúrgica do fígado. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 5, p. 407–414, 2003.
- UEMURA, E. . Autonomic Nervous System. **Fundamentals of Canine Neuroanatomy and Neurophysiology**, p. 397–399, 2015.
- ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.
- WANG, T.-Y.; LIU, C.; WANG, A.; SUN, Q. Intermittent cold exposure improves glucose homeostasis associated with brown and white adipose tissues in mice. **Life Sciences**, v. 139, p. 153–159, 2015.
- WILLIAMS, G. R.; BASSETT, J. H. D. Local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase: Deiodinases: the balance of thyroid hormone. **Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 3, p. 261–272, 2011.
- WILLIAMS, K.; STRANGE, P. G.; BENNETT, T. Alterations in β -adrenoceptor number and catecholamine content of chick atria after reversible sympathetic denervation with 6-hydroxydopamine. **Archives of Pharmacology**, v. 336, p. 64–69, 1987.
- XUE, C.; ASPELUND, G.; SRITHARAN, B. A.; JIN, P.; ANDERSEN, D. **Xue-Isolated Hepatic Cholinergic Denervation**, 2000. .
- YI, C. X.; LA FLEUR, S. E.; FLIERS, E.; KALSBECK, A. The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p. 416–431, 2010.