

SANDRA CAMPOS RODRIGUES

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL E MOLECULAR DE ADAPTAÇÕES NO
METABOLISMO ENERGÉTICO HEPÁTICO AO FINAL DO PERÍODO DE
PRENHEZ EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

SANDRA CAMPOS RODRIGUES

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL E MOLECULAR DE ADAPTAÇÕES NO
METABOLISMO ENERGÉTICO HEPÁTICO AO FINAL DO PERÍODO DE
PRENHEZ EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvana A. Bordin da Silva

Versão Corrigida

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Campos Rodrigues, Sandra.

Avaliação funcional e molecular de adaptações no metabolismo energético hepático ao final do período de prenhez em ratas / Sandra Campos Rodrigues. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Metabolismo energético hepático.

Versão do título para o inglês: Functional and molecular evaluation of energy metabolism adaptations in liver from pregnant rats.

Descritores: 1. Sinalização intracelular 2. Prenhez 3. Gliconeogênese 4. Fígado I. Silva, Silvana Auxiliadora Bordin da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB057/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sandra Campos Rodrigues.

Título da Dissertação: Avaliação funcional e molecular de adaptações no metabolismo energético hepático ao final do período de prenhez em ratas .

Orientador(a): Silvana Auxiliadora Bordin da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **34** nas fls. **68** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Silvana A Bordin da Silva, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo da via da AMPK na adaptação metabólica hepática durante o período perinatal** do qual participou(aram) o(s) alunos **Sandra Campos Rodrigues** e a pesquisadora **Tatiane Cristina de Araújo Nogueira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **02.04.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 03 de abril de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que me deram a vida, apoiaram-me incondicionalmente em todas as etapas do meu desenvolvimento e em todas as minhas ambições pessoais e profissionais. Meus grandes exemplos e incentivadores intelectuais.

À minha orientadora Silvana Bordin, por ter me acolhido com confiança e respeito em seu laboratório, por sua dedicação à minha formação científica. Agradeço por me permitir fazer parte de seu grupo e pela liberdade que me proporciona na pesquisa.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro e prestígio que me proporcionaram a realização do mestrado com a dedicação e excelência necessárias.

À Tatiane Nogueira, minha amiga e colaboradora por ter me ensinado através de seu exemplo como ser competente e dedicada na carreira acadêmica.

Aos pesquisadores Gabriel Anhê e Camilo de Lellis pela ajuda nos experimentos, pela disposição nas discussões dos resultados e rumos da pesquisa.

Aos meus colegas de pós-graduação Lucas Pantaleão, Laila Romagueira, Renato Nachbar e Cristiane Oliveira pela boa vontade no auxílio nos experimentos.

À professora Luciana Caperuto que sempre me auxiliou no laboratório com muita disposição e carinho.

A todos os colegas, pesquisadores, amigos e professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica que me ajudaram e engrandeceram meu conhecimento teórico e prático ao longo do mestrado.

Ao secretário de pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, José Maria Rodrigues Júnior, pelo exemplo de funcionário público dedicado, competente e bem humorado, sem o qual eu teria tido muito mais dificuldades em todas as etapas cumpridas na pós-graduação desde o meu ingresso.

Aos meus amigos Rafael Prévide e Katherine Veras por serem irmãos em tudo, pelas alegrias e tristezas compartilhadas, por terem me suportado e me apoiado em todos os momentos.

À Adriano Zager pela compreensão, dicas acadêmicas e pela paciência com que sempre me apóia e incentiva na carreira científica.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

CAMPOS-RODRIGUES, S. **Avaliação funcional e molecular de adaptações no metabolismo energético hepático ao final do período de prenhez em ratas.** 2011. 54 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A participação do fígado na homeostasia da glicose materna ainda não está esclarecida. Este estudo avaliou a produção hepática de glicose em ratas prenhes e controle bem como algumas das principais vias metabólicas hepáticas envolvidas nas alterações metabólicas mediadas pelo fígado ao final do período de prenhez em ratas. Houve diminuição do conteúdo de glicogênio hepático e glicose circulante em ratas prenhes. A taxa de gliconeogênese diminuiu em prenhes assim como o conteúdo de IR e sua fosforilação em tirosina mediante estímulo com insulina, porém a fosforilação em serina da AKT e o conteúdo e expressão gênica da PEPCK, mantêm-se como em controles. Há aumento do conteúdo de PTP1B e de sua associação ao IR na presença de insulina. Houve diminuição do conteúdo de G6Pase, AMPK total e da fosforilação da AMPK α /1 e, conseqüentemente, da fosforilação da ACC em ratas prenhes. Há aumento de triglicérides circulantes e diminuição de triglicérides no tecido hepático. Aumenta a expressão gênica da FAS e diminuem as expressões de G-6-Pase, MEs, LXR, SREBP1 e PFK. Os resultados indicam não haver resistência à insulina no fígado de ratas prenhes e que a atividade metabólica hepática no período está voltada para a síntese *de novo* de ácidos graxos.

Palavras-chave: Sinalização intracelular. Prenhez. Gliconeogênese. Fígado.

ABSTRACT

CAMPOS-RODRIGUES, S. **Functional and molecular evaluation of energy metabolism adaptations in liver from pregnant rats.** 2011. 54 p. Masters thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The involvement of the liver in maternal glucose homeostasis is still unclear. This study evaluated the hepatic glucose production in pregnant rats and some of the hepatic metabolic pathways involved in metabolic disorders mediated by the liver in late pregnancy. There was a decrease in liver glycogen content and plasma glucose in pregnant rats. The rate of gluconeogenesis decreased as well as the contents of IR tyrosine phosphorylation after insulin stimulus, but the pSer-AKT, PEPCK, SHP2 contents, SHP2-IR association and the expression of PEPCK remained unaltered. The content of PTP1B and its association with IR decreases in the presence of insulin. The content of G6Pase, AMPK and the phosphorylation of AMPK $\alpha/1$ and consequently the phosphorylation of ACC decreases in liver from pregnant animals. Triglyceride levels and the expression of FAS was increased in pregnant rats whereas the triglycerides reduced in the liver. The expression of G-6-Pase, MEs, LXR, SREBP1 and PFK decreased in the liver of pregnant rats. The results indicate no insulin resistance in the liver of pregnant rats, and that hepatic metabolic activity in this period is focused on *de novo* fatty acids synthesis.

Key words: Intracellular signaling. Pregnancy. Gluconeogenesis. Liver.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
1.2 PREENHEZ	11
1.2 METABOLISMO ENERGÉTICO HEPÁTICO NA PREENHEZ	13
1.3 PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MONOFOSFATO DE ADENOSINA	14
1.4.1 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS	15
1.4.2 METABOLISMO LIPÍDICO	16
1.5 O MODELO DO ESTUDO	17
2 OBJETIVO	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 ANIMAIS	19
3.2 ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO	19
3.3 GLICEMIA BASAL.....	20
3.4 PERFUSÃO HEPÁTICA DE PIRUVATO IN SITU	20
3.5 PRODUÇÃO DE GLICOSE APÓS SOBRECARGA INTRAPERITONIAL DE PIRUVATO.....	21
3.6 IMUNOBLOTTING	22
3.6.1 IMUNOPRECIPITAÇÃO	23
3.7 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DOS LIPÍDEOS HEPÁTICOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	24
3.7.1 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS DO FÍGADO	24
3.7.2 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.	24
3.8 PCR TEMPO REAL.....	25
3.8.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	25
3.8.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	25
3.8.3 PCR TEMPO REAL	26
3.9 ANÁLISES LIPÍDEOS CIRCULANTES	28

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4 RESULTADOS	29
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O fluxo de substratos energéticos entre os tecidos provedores (fígado, musculatura esquelética, tecido adiposo) e o sangue são finamente regulados de modo a prover o organismo de energia para seu funcionamento adequado.

Inúmeras patologias estão relacionadas ao metabolismo energético, talvez a mais conhecida seja o diabetes mellitus. O tipo I do diabetes ocorre quando há perda da funcionalidade da parte endócrina das ilhotas pancreáticas e conseqüentemente supressão da produção hormonal de insulina e perda dessas ações hormonais em todo o organismo. O diabetes tipo II apresenta um quadro de síndrome metabólica caracterizado por resistência à ação da insulina em tecidos periféricos com persistência de quadro de hiperglicemia que pode desencadear perda da função endócrina pancreática e evolução do quadro semelhante ao diabetes tipo I.

O diabetes é um problema global de saúde pública, estima-se que nos Estados Unidos 11,2% dos homens e 10,2% das mulheres acima de 20 anos de idade tem diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

1.2 PREENHEZ

A prenhez é um período em que a fêmea é transitoriamente submetida a alterações metabólicas que resultam em um quadro semelhante à síndrome metabólica, mas que geralmente são cuidadosamente reguladas para fornecer um suprimento ideal de substratos da mãe para o feto. No final da gestação, observa-se a ocorrência de um quadro de resistência periférica à ação da insulina, porém este tende a regressão após o parto e início da lactação.

De modo geral, no início do período, a fêmea prenhe apresenta incremento no anabolismo, estando os tecidos mais sensíveis à captação de aminoácidos e glicose

(NAISMITH; MORGAN, 1976; HERRERA, 2000) o que também ocorre pontualmente durante algumas fases da lactação, porém de maneira dependente de fatores ambientais e número de crias (DENIS; WILLIAMS; VERNON, 2003). Grande parte desta ação se deve a uma maior sensibilidade à insulina nesse período, havendo alta captação de glicose principalmente no tecido adiposo e muscular (HERRERA, 2000). Já no fim da prenhez o que se nota é uma menor sensibilidade à insulina, de modo a aumentar a disponibilidade de seu principal substrato, a glicose, para o feto (SMITH; GROVE, 2002).

Todas essas alterações no metabolismo energético materno e as diferenças observadas no início e final da prenhez são reguladas por inúmeros hormônios, notadamente os hipofisários, ovarianos e do córtex adrenal, reajustados por ocorrência da concepção e que vão garantir a continuidade da formação de um novo ser. As alterações hormonais que ocorrem na prenhez induzem modificações na transmissão dos diferentes sinais hormonais e da amplitude do efeito celular aos hormônios nos tecido-alvo.

Por exemplo, os esteróides sexuais, que durante a prenhez são mantidos em níveis altos, se relacionam com a regulação do metabolismo energético, agindo diretamente sobre o pâncreas endócrino. A administração de estrógenos induz aumento do conteúdo de insulina em pâncreas de ratos que pode contribuir para a hiperinsulinemia observada durante a prenhez em mamíferos. Há também regeneração e hipertrofia de ilhotas pancreáticas em modelo animal de pancreatectomia parcial tratado com estrógenos (HOUSSAY; FOGLIA; RODRIGUEZ, 1954).

Em ratas, observa-se também no final da prenhez uma alta taxa de utilização de glicose pelo concepto, que representa cerca de 30% da taxa de utilização total de glicose pelo organismo materno (LETURQUE et al., 1986). Este fluxo representativo de glicose direcionado ao concepto é garantido pela resistência à ação da insulina no tecido adiposo (FERRE et al., 1986) e na musculatura composta predominantemente por fibras glicolíticas (LETURQUE et al., 1986). Quando levados em consideração todos os tecidos responsivos à insulina, a captação de glicose materna diminui de 40 a 60% durante uma gravidez/prenhez normal, tanto em humanos como em roedores (HORNNES, 1985; ROSSI et al., 1993).

1.2 METABOLISMO ENERGÉTICO HEPÁTICO NA PREENHEZ

Sabe-se que a utilização das reservas energéticas hepáticas é variável de acordo com a situação nutricional. No jejum, o fígado é o principal produtor de glicose, quebrando o glicogênio hepático e sintetizando glicose a partir de lactato, aminoácidos, glicerol e piruvato; a lipogênese é diminuída e a oxidação de ácidos graxos e a cetogênese são ativadas visando suprir os tecidos extra-hepáticos de energia e combustíveis metabólicos. Em função dessa ação do fígado sobre os substratos energéticos disponíveis para o organismo, alterações em seu funcionamento podem claramente afetar o metabolismo e a homeostasia energética geral, sendo, portanto, base do desenvolvimento de doenças metabólicas como diabetes tipo II e a síndrome metabólica (VIOLLET et al., 2009).

Os dados da literatura referentes à participação do fígado na resistência à insulina durante a prenhez ainda são conflitantes. Há relatos de aumento (GONZALEZ et al., 2003) e de redução da fosforilação do IRS1 induzida por insulina no animal prenhe (SAAD et al., 1997) além de aumento da atividade de fosfatases associadas a membranas (HAUGUEL-DE MOUZON, 1993), porém sem alteração de alvos importantes da insulina, da quantidade de glicogênio hepático (HERRERA; KNOPP; FREINKEL, 1969; KILGOUR; VERNON, 1987) e da capacidade de suprimir a produção hepática de glicose (NOLAN; PROIETTO, 1996).

A ligação da insulina à subunidade extracelular do seu receptor de membrana (IR) estimula sua atividade enzimática, promovendo sua auto-fosforilação em vários resíduos de tirosina. Essa auto-fosforilação ativa o receptor, o que leva a fosforilação de substratos intracelulares, denominados substratos do receptor de insulina (IRSs). (SAAD, 1994). A fosforilação em resíduos de serina e treonina inativa esse receptor e atualmente é considerada potente modulador dos efeitos da insulina (ZIERATH; WALLBERG-HENRIKSSON, 2002).

Após a fosforilação em diversos resíduos de tirosina, os IRSs atuam como proteínas acopladoras da subunidade regulatória da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). A ligação da subunidade p85 da PI3K ao substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) estimula a atividade quinase da subunidade catalítica p110 e a ativação dessa proteína promove vários efeitos biológicos da insulina, dentre eles a

captação de glicose, translocação de transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana plasmática, síntese de glicogênio e de ácido desoxirribonucléico (DNA) e ativação da lipólise (DE FRONZO; MIKI; STEINKE, 1967; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006).

Estudos recentes têm demonstrado que vias de sinalização que são independentes do sinal intracelular desencadeado pelo receptor de insulina desempenham um papel crucial na regulação de eventos metabólicos tais como a captação de glicose dependente da translocação de vesículas de GLUT4 e a produção hepática de glicose proveniente da gliconeogênese. Uma destas vias alternativas à sinalização da insulina envolve a ativação de uma proteína quinase dependente de AMP, a AMPK.

1.3 PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MONOFOSFATO DE ADENOSINA

A AMPK é um complexo heterotrimétrico que apresenta três sub-unidades, uma catalítica ($\alpha/1$) e outras duas não catalíticas ($\beta/2$ e γ) (HARDIE; CARLING, 1997). Cada subunidade apresenta duas ou mais isoformas: α_2 , β_1 , γ_1 ou γ_3 (MAHLAPUU et al., 2004). A sub-unidade β ou 2 atua como uma estrutura que mantém as sub-unidades α ou 1 e γ ligadas a ela, a subunidade γ tem sido proposta como ligante de 5'AMP. Mutações na subunidade γ podem acarretar problemas no metabolismo de glicogênio (CHEUNG et al., 2000; ARAD et al., 2002).

A AMPK atua como um sensor do *status* energético celular na maioria dos tecidos e órgãos, pois integra os sinais nutricionais e hormonais. De modo geral age estimulando a captação de glicose e a oxidação de lipídios, enquanto suprime processos consumidores de energia, controlando assim a homeostase glicêmica pela regulação do metabolismo em vários tecidos periféricos chave da patologia do diabetes tipo II, como fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e células β pancreáticas (LONG; ZIERATH, 2006).

A ativação da AMPK é primariamente regulada pelo AMP; quando a razão AMP/ATP intracelular aumenta, a ativação direta da AMPK pelo AMP se dá de maneira conjunta com sua fosforilação em treonina 172 (CORTON; GILLESPIE; HARDIE, 1994). A ligação ao AMP expõe a subunidade α da AMPK, de modo que essa acaba por ser fosforilada por uma de duas enzimas distintas, a CaMKK

(quinase da quinase dependente de calmodulina) e a LKB1 (serina-treonina proteína quinase). Durante o processo de contração muscular, a ativação da AMPK envolve a fosforilação de uma quinase anterior, a AMPKK (HAWLEY et al., 1996) e a hidrólise de ATP em ADP + Pi para produzir energia (CORTON; GILLESPIE; HARDIE, 1994).

1.4.1 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

Vários estudos já demonstraram que a AMPK e CaMKK estão envolvidas na captação de glicose pela atividade contrátil. As CaMKs são proteínas que fosforilam substratos importantes para a transcrição gênica e também atuam na secreção de vesículas, na regulação de canais iônicos e na morfogênese celular (TOMBES; FAISON; TURBEVILLE, 2003). A descrição desses mecanismos permitiu que se compreendessem como essas vias são alvo de drogas hipoglicemiantes tais como metformina e tiazolidinediona (KROOK; WALLBERG-HENRIKSSON; ZIERATH, 2004) usadas no tratamento do diabetes tipo II.

A AMPK fosforila diretamente e regula a ação de enzimas (o que pode ativá-las ou desativá-las) envolvidas na síntese de carboidratos, lipídios e proteínas. Por ação indireta, de longo prazo, regula fatores transcricionais atuantes nessas vias metabólicas (LONG; ZIERATH, 2006).

No tecido muscular e adiposo, AMPK aumenta a captação de glicose, pois esta enzima estimula a translocação de vesículas ricas em GLUT4 de modo dependente da fosforilação do substrato AS-160 da proteína quinase B (AKT) (BRUSS et al., 2005). Além disto, a AMPK diminui a secreção de insulina pelas células β pancreáticas e reduz a ingestão alimentar quando ativada em centros específicos do hipotálamo (LONG; ZIERATH, 2006). A ativação da AMPK no fígado resulta na inibição da produção de glicose em decorrência da diminuição da expressão das enzimas fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) que controlam principalmente a gliconeogênese (POSTIC; DENTIN; GIRARD, 2004), enquanto que, por sua vez, a glicogenólise e a glicólise dependem da ativação da enzima fosfofrutoquinase (PFK) que regula esses processos.

1.4.2 METABOLISMO LIPÍDICO

Além da modulação do metabolismo de carboidratos, a AMPK estimula a oxidação de ácidos graxos e inibe a síntese de triacilgliceróis no tecido hepático. O efeito da AMPK sobre o metabolismo de lipídeos é decorrente principalmente da capacidade desta enzima fosforilar e inibir a Acetil-CoA Carboxilase (ACC). (HARDIE; CARLING, 1997).

A ACC é uma das proteínas-alvo bem caracterizadas da AMPK ativa. (RUDERMAN; PRENTKI, 2004). Sua inativação, mediada pela fosforilação pela p-AMPK, leva à síntese de colesterol e inibição da síntese de triacilgliceróis (HARDIE; CARLING, 1997; RUDERMAN; PRENTKI, 2004), podendo, portanto, modular o metabolismo de ácidos graxos via fígado. Sabe-se também que a ativação da AMPK leva a um aumento na oxidação de ácidos graxos, dependente da inibição da ACC pela AMPK (RUDERMAN et al., 2003; SMITH; BRUCE; DYCK, 2005).

A síntese *de novo* de ácidos graxos, processo em que carbonos provenientes de carboidratos são transformados em lipídeos no fígado (PARKS, 2002), é um mecanismo em que a ACC participa de forma crucial. Embora a lipogênese *de novo* seja altamente ativa em roedores, sua contribuição para o fluxo de ácidos graxos em humanos ainda não foi bem definida, devido à falta de métodos capazes de mensurar a síntese *in vivo* de lipídios em humanos (PARKS, 2002).

Vários fatores, inclusive nutricionais, regulam a expressão das enzimas que participam da lipogênese. ACC catalisa a carboxilação da acetil-CoA, reação mais importante na regulação da síntese *de novo* de ácidos graxos e a síntese de ácidos graxos (FAS), enzima anabólica responsável pela produção de ácidos graxos, que converte a malonil CoA em palmitato. Há indícios de que dietas hipolipídicas e hiperglicídicas estimulam consideravelmente a lipogênese (UYEDA; YAMASHITA; KAWAGUCHI, 2002), aumentando a expressão de enzimas lipogênicas (DELZENNE et al., 2001).

O receptor LXR (*Liver X receptors*) regulam uma série de genes alvo envolvidos no metabolismo hepático de colesterol e ácidos graxos (ULVEN et al., 2005). São conhecidos como fatores de transcrição que desempenham funções de

regulação central na absorção de lipídeos, no metabolismo e no efluxo de colesterol. LXR é ativado por colesterol oxidado, de modo que alterações no consumo de lipídeos, bem como em seu processamento, podem influenciar a atividade transcricional dos genes regulados pelos receptores LXR (SZANTO; ROSZER, 2008). Dentre esses, os fatores de transcrição SREBP (*sterol regulatory binding proteins*) aumentam preferencialmente a transcrição de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, por exemplo, o da ACC (STOECKMAN; TOWLE, 2002).

1.5 O MODELO DO ESTUDO

Pelo fato de ser o fígado um dos principais tecido-alvo dos hormônios reguladores do fluxo de energia, como a insulina e o glucagon, diferentes vias bioquímicas intracelulares são continuamente ativadas nesse órgão, o que garante a regulação de processos centrais do metabolismo energético, como a glicólise, gliconeogênese e glicogenólise. Tais eventos metabólicos ocorrem também no fígado ou são regulados por este órgão em diferentes estágios de nutrição e balanço energético e estão diretamente ligados a distúrbios e patologias como obesidade e diabetes. Assim, a redefinição do fluxo energético da prenhez se relaciona a importante participação de alterações da maquinaria protéica hepática.

Neste estudo, enfocamos as alterações metabólicas e suas vias no final da prenhez em ratas Wistar, em especial o envolvimento na via da AMPK na produção hepática de glicose. Diferente do tecido adiposo e músculo esquelético, a participação do fígado nas alterações do fluxo energético materno ainda não está completamente esclarecida.

2 OBJETIVO

Avaliar, no fígado de ratas no final do período de prenhez, a produção dos principais substratos energéticos e caracterizar algumas das alterações metabólicas hepáticas ocorrentes no período bem como esclarecer a participação das principais vias metabólicas (via da AMPK e via da insulina) envolvidas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar prenhes e virgens, separadas para cruzamento a partir de 2,5 meses de idade, fornecidas pelo Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (SP), alimentadas com ração padronizada para roedores Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes S.A.) e água *ad libitum* e mantidas em ciclo claro/escuro de 12:12 horas e temperatura ambiente de 23 °C .

A verificação do ciclo estral das ratas foi realizada por esfregaço vaginal, por pelo menos duas semanas antes do acasalamento. As ratas com ciclo normal e regular foram então mantidas na proporção de duas fêmeas por macho por gaiola por um período de 12 horas. Na manhã seguinte, foi feito um lavado vaginal para verificação da presença de espermatozóides (indicativo do 1º dia de prenhez). Foram utilizadas como controles (CTL) ratas virgens de mesma idade daquelas destinadas aos cruzamentos. As ratas prenhes foram utilizadas para os experimentos no 19º dia da prenhez (P19) e os tecidos extraídos foram usados para avaliação dos mesmos parâmetros experimentais em ambos os grupos.

3.2 ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO

Para a extração e determinação do conteúdo de glicogênio hepático, retirou-se parte do fígado das ratas a serem sacrificadas e foi feita a dissecação do material biológico em gelo, estando o tecido embebido em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Uma porção de 300 a 500 mg de tecido foi colocada em 2 ml de KOH 30% em tubos de centrífuga que foram hidrolisados em banho-maria fervente por uma hora. Em seguida, os tubos contendo o tecido hepático foram submetidos a fase de digestão, sendo, para tal, acrescidos de 0,2 ml de Na₂SO₄ saturado a 40%.

Continuadamente, foram acrescentados 4,5 ml de álcool etílico a 95% ou absoluto e os tubos agitados com bastão de vidro e submetidos a temperatura entre 50 °C e 60°C em banho-maria por cerca de 15 segundos até o álcool atingir fervura; então os tubos foram retirados permitindo a precipitação do material de interesse.

Os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante contendo lipídeos e proteínas foi retirado com bomba de sucção, acoplada a uma pipeta de *Pasteur*.

Os tubos foram invertidos de modo a que o restante do sobrenadante escorresse e a partir dessa etapa, o precipitado foi ressuspenso em água destilada quente e os tubos agitados e aquecidos até que todo o glicogênio fosse dissolvido. Acrescentou-se 4,5 ml de álcool etílico e os tubos foram novamente agitados e aquecidos por cerca de 15 segundos até o álcool atingir fervura, então, mais uma vez, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante retirado. O precipitado das amostras foi primeiramente diluído em 25 ml de H₂O e logo após, diluído pela segunda vez, em que alíquotas de 1 ml da primeira diluição foram depositadas em tubos contendo 0,01 ml de solução de fenol (800 mg de fenol acrescidos de 0,2 ml de H₂O e dissolvidos em água fervente) e 2 ml de H₂SO₄. Depois os tubos foram agitados e levados a banho fervente por 15 minutos. Após estes procedimentos, a concentração do glicogênio foi lida no espectrofotômetro (*Gene Quant, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, RU*) a 490 nm. Todos os valores obtidos para a concentração de glicogênio hepático foram normalizados para 100 mg/fígado em relação ao peso da alíquota analisada.

3.3 GLICEMIA BASAL

No período da manhã, antes do sacrifício, as ratas foram anestesiadas e realizou-se uma pequena incisão na cauda do animal em que foram retirados aproximadamente 2 µl de sangue e o nível de glicose sanguínea foi dosado com aparelho apropriado para dosagem glicêmica (*Accu-Check, Roche, São Paulo, SP, Brasil*).

3.4 PERFUSÃO HEPÁTICA DE PIRUVATO IN SITU

As ratas prenhes e controle foram mantidas em jejum de 12 horas e durante o período da manhã tiveram o fígado perfundido em um sistema não recirculante, usando meio sem hemoglobina e monovascular, como previamente descrito (*VARDANEGA-PEICHER et al., 2003*). Os animais foram primeiramente

anestesiados com tiopental sódico (25 mg/kg de peso corporal) e então submetidos à laparotomia para exposição da veia porta e cava. A veia cava superior foi então canuleada e o fluido de perfusão, Krebs-Henseleit (NaCl 115 mM, NaHCO₃ 24 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM; pH 7,4, saturado com uma mistura de 95%:5% de O₂:CO₂), foi introduzido através de uma cânula na veia porta, enquanto uma segunda cânula na veia cava inferior foi usada para saída do perfusato. O fluxo de Krebs foi corrigido de acordo com o peso do fígado estimado de cada animal (4 mL min⁻¹g⁻¹ de peso fresco). O peso do fígado foi considerado 4% do peso do animal, que posteriormente ao sacrifício foi confirmado por pesagem (peso do fígado em relação ao peso do animal). Todos os animais foram submetidos à perfusão somente com Krebs nos primeiros 10 minutos, antes da perfusão com Krebs contendo piruvato (10 mM). O perfusato somente com Krebs foi coletado primeiramente de 2 em 2 minutos (tempos -10,-8,-6,-4 e -2 sem Krebs) e em seguida a cada minuto (tempo -1 e 0 sem Krebs). Logo após a perfusão com Krebs contendo piruvato as coletas foram realizadas a cada 5 minutos (tempos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos com Krebs + piruvato). As amostras coletadas foram submetidas à dosagem de glicose por teste enzimático (Glicose Pap Liquiform ref. 84-2/500), seguindo-se as instruções do fabricante. As concentrações finais de glicose foram obtidas por leitura no espectrofotômetro a 505 nm e normalizadas para o peso total estimado do fígado. As áreas sob as curvas, expressas em µmol/g de peso de fígado fresco, foram calculadas utilizando-se o *software GraphPad Prism* (versão 5.0).

3.5 PRODUÇÃO DE GLICOSE APÓS SOBRECARGA INTRAPERITONIAL DE PIRUVATO

O teste de tolerância intraperitoneal ao piruvato foi realizado com a finalidade de estimar a taxa de gliconeogênese em cada animal (YAO; NYOMBA, 2008). As ratas foram mantidas em jejum de 12 horas durante a noite anterior ao experimento. Após anestesia, receberam uma injeção intraperitoneal de piruvato (2g/kg) dissolvido em uma solução de NaCl 0,9% (m/v). A glicemia então foi medida nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, a partir de sangue total colhido de uma pequena incisão na cauda do animal.

3.6 IMUNOBLOTTING

Após sacrifício das ratas por decapitação, um fragmento do fígado foi removido e homogeneizado com o uso de um processador *Polytron*® (PT 2100, Kinematica AG, Lucerne, Suíça) em tampão de extração (1% de SDS, 100 mM de Tris [pH 7,4], 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 100 mM de ortovanadato de sódio e 250 mM de NaCl). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 96 °C e em seguida centrifugadas para a remoção do material insolúvel (12.000 rpm por 10 minutos a 4°C). Parte do sobrenadante foi utilizada para determinação do conteúdo protéico por espectrofotometria com reagente *Bradford* (Biorad, CA, EUA) segundo o método descrito por (BRADFORD, 1976) e o restante foi diluído em tampão Laemmli (1:5 v/v) contendo ditioneitol 100 mM e incubado por 10 minutos a 96 °C e submetido à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 6 a 10% (%T) com dodecil sulfato de sódio (*SDS-PAGE*) em aparelho para minigel (*Mini Protean III*, Bio-Rad, CA, EUA).

As proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, EUA) em aparato para transferência elétrica semi-seca (Bio-Rad, CA, EUA). As membranas foram posteriormente bloqueadas com uma solução de albumina sérica bovina ou leite desnatado em pó a 5% por 2 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos contra as proteínas: AMPK (α ou 1/ β ou 2), p-AMPK (1 ou α), ACC, p-ACC, IR, IRS-1, IRS-2, ps-AKT, PEPCK, G6Pase, PTP1B, SHP2 e β -actina por 4 horas à temperatura ambiente ou 12 horas a 4 °C. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (*Amershan Pharmacia*, RU) e reagentes de detecção do kit de quimioluminescência (ECL, *Amershan Pharmacia*, RU). As membranas foram então expostas durante tempos variados em filmes de raio-X. Depois de revelados, os filmes foram submetidos à análise de densitometria óptica utilizando o *software Scion Image* (Scioncorp, EUA).

3.6.1 IMUNOPRECIPITAÇÃO

Alíquotas de cada amostra de fígado foram homogeneizadas e submetidas à extração protéica da mesma forma descrita para *Imunoblotting*, porém utilizando-se tampão de extração para imunoprecipitação (1% de Triton X 100, 100 mM de Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C.). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado (12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C) para a obtenção do sobrenadante e foi determinado o conteúdo protéico de cada amostra por espectrofotometria com reagente *Bradford*, conforme descrito anteriormente para *Imunoblotting*. Separou-se aproximadamente 500 µl do sobrenadante (contendo aproximadamente 500 µg de proteína/ml) que foi incubado por 5 horas à 4 °C com 10 µl de anticorpo contra IR, de modo a permitir a ligação entre a proteína e o anticorpo para formação de complexo. Após esse período, foram acrescentados 50 µl de Proteína A Sefarose 6MB aos tubos contendo as amostras, que incubaram no mínimo por 2 horas à 4 °C, incentivando-se assim a precipitação do complexo protéico formado. Nova centrifugação foi realizada (5000 rpm por 15 minutos a 4 °C) e o sobrenadante foi retirado. Fez-se então três lavagens do material depositado (proteína A contendo o complexo protéico formado por antígeno-anticorpo) com tampão de lavagem para imunoprecipitado (2 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl; 1 mM RDTA; 0,5% Triton X-100) seguidas de centrifugação (5000 rpm por 15 minutos a 4 °C) e retirada do sobrenadante para purificação das amostras. Estas foram então diluídas em tampão Laemmli (1:5 v/v) e incubadas por 10 minutos a 96°C.

Alíquotas de cada amostra, contendo 30 µg de proteínas totais foram então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE* 8% e 6,5%) e realizou-se a transferência das proteínas separadas no gel eletricamente para uma membrana de nitrocelulose conforme descrito anteriormente. A seguir se deu o bloqueio das membranas e a incubação com os anticorpos primário e secundário para fosforilação em tirosina, SHP2 e PTP1B. A revelação das membranas foi feita utilizando-se filmes de raios-X e a quantificação foi feita pelo *software Scion*, como já citado.

3.7 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DOS LIPÍDEOS HEPÁTICOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

3.7.1 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS DO FÍGADO

Os lipídeos totais presentes no fígado de ratas prenhes e controle foram obtidos por extração para serem então submetidos à cromatografia. A extração se deu da seguinte forma: Amostras de 30 a 40mg de fígado foram homogeneizadas com o uso de um processador *Polytron®* em 500 µl de metanol e 1 ml clorofórmio e 300 µl de H₂O. Após centrifugação, foi realizada uma re-extração com volumes menores dos mesmos solventes e água a fim de concentrar todo o conteúdo lipídico existente na alíquota de fígado. Desprezou-se a fase aquosa superior e a concentração final dos lipídios se deu por evaporação total dos solventes realizada em equipamento *Speed Vac® (Thermo Scientific)*.

3.7.2 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.

O concentrado lipídico obtido a partir de amostras do fígado de ratas prenhes e controle foi utilizado na realização da técnica de cromatografia de camada delgada. Para tal, o extrato lipídico total de cada amostra foi ressuspenso em 50 µl de solução de clorofórmio/metanol (2:1, v/v) e cromatografados utilizando placa de cromatografia de camada delgada com fase estacionária de 250 µm de sílica gel (*Sigma Chemical Co*) e fase móvel constituída de hexano/dietil éter/ácido acético (70:30:1, v/v/v). A placa foi mantida em uma câmara contendo iodo para a visualização das frações lipídicas, que posteriormente foram digitalizadas para quantificação relativa (percentual do total de lípidos de uma mesma amostra).

3.8 PCR TEMPO REAL

3.8.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Fragmentos de 0,1g de tecido hepático foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente o RNA total das amostras foi extraído pela técnica com *Trizol*® (*Invitrogen*, USA). Para isso, acrescentou-se à amostra 1 ml de solução de *Trizol*® e foi feita a homogeneização em *Polytron*®, após esta etapa foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio ao homogeneizado e posteriormente realizada uma centrifugação a 12.000 rpm para recuperação da fase aquosa superior. A esta foi adicionado 0,5 ml de isopropanol e feita uma nova centrifugação a 12.000 rpm para obtenção do precipitado ao qual foi adicionado etanol 75% de modo a realizar uma ressuspensão do material que novamente foi centrifugado a 12.000 rpm. O precipitado final, sem resíduo de etanol, foi ressuspensão em 100 a 200 µl de água DEPC (água tratada com dietil pirocarbonato- *Signa*, S. Louis, EUA).

A leitura da concentração de RNA foi realizada a 260 nm em espectrofotômetro (*Gene Quant*, *Amershan Pharmacia Biotech*, Cambridge, RU), para tal fez-se a diluição de 1 µl de RNA em 79 µl de água DEPC. A leitura permitiu o cálculo da concentração de RNA na amostra, sendo que uma unidade de densidade óptica (DO) corresponde a aproximadamente 40 µg/ml de fita simples. A relação DO 260/DO 280, permitiu estimar a pureza do ácido nucléico na amostra.

3.8.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA

As amostras com 2 µg de RNA total foram submetidas à reação de transcriptase reversa com *primers* randômicos e oligo-dT. Para isso, foi adicionado em cada amostra: tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3; 75mM de KCl; 3mM e MgCl₂), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (0,5mM cada), *primers* randômicos (150 ng), inibidor de RNase (40U) e a enzima *SuperScript II* (200U; *Invitrogen*, EUA), em volume final de 20 µl. As reações foram incubadas por 50 minutos a 42 °C, seguida de aquecimento à 70 °C por 15 minutos para denaturação da enzima. Ao final da reação pôde-se então construir cDNAs (DNAs completos) a partir do RNA

mensageiro (mRNA) que foram amplificados pelo PCR (reação de polimerase em cadeia). Seguiu-se então a padronização do número de ciclos necessários para a amplificação adequada do cDNA correspondente a cada gene estudado (curva de ciclos).

3.8.3 PCR TEMPO REAL

Seguindo-se criteriosamente as recomendações do fabricante, foram realizados os experimentos e PCR em tempo real nas condições controle (CTL) e prenhe (P19). A análise dos resultados foi feita utilizando o *software* disponibilizado pelo fabricante. Resumidamente, para cada condição acima descrita, foram calculados os valores de ΔCt para cada gene de interesse ($\Delta Ct = Ct^{\text{gene de interesse}} - Ct^{\text{gene constitutivo}}$). Em seguida, tomando-se como referência os valores de ΔCt^{CTL} , calculou-se os valores de $\Delta\Delta Ct$, resultados da subtração $\Delta Ct^{\text{CTL}} - \Delta Ct^{\text{P19}}$. Os primers utilizados estão listados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequências *sense* e *antisense* dos *primers* utilizados no PCR tempo-real.

<i>Gene</i>	<i>Sense / Antisense</i>	<i>TM(°C)</i>	<i>Produto(bp)</i>
PEPCK	TGGTCTGGACTTCTCTGCCAAG AATGATGACCGTCTTGCTTTTCG	58	285
G6Pase	ACCTTCTTCCTGTTTGGTTTCGC CGGTACATGCTGGAGTTGAGGG	58	206
PFK	CAGTGGTGGCTGAATCTGCG CCGAGTTCCATGTGAGTTCCC	57	133
FAS	TGGTGAAGCCCAGAGGGATC CACTTCCACACCCATGAGCG	57	127
ME1	ACTGATGGAGAGCGAATCCTCG TTTCTGTGCCACGTCCAAAG	57	145
ME2	GCAGGTGCTTGTTTGCCAGTG TTGGGATGTCAGTGCCTTTGC	57	188
ME3	CCCACAGCAATTATAGGTGTGCGC TCCACTGGCAAAGATTCCTCG	58	183
LXR	CAATGATGCTGAATTTGCTCTGC CACTTGCTCTGAATGGACGCTG	57	223
SREBP1	GGAGCCATGGATTGCACATT AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA	57	191
RPL37a	CAAGAAGGTCGGGATCGTTCG ACCAGGCAAGTCTCAGGAGGTG	57	290

3.9 ANÁLISES LIPÍDEOS CIRCULANTES

A determinação dos parâmetros circulantes de colesterol total, colesterol HDL e triglicérides no soro de ratas prenhes e controle foi realizada utilizando-se *kits* comerciais. Após a decaptação das ratas na ocasião do sacrifício foi coletado o sangue e este rapidamente centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. O soro obtido foi utilizado conforme orientação do fabricante para determinação do Colesterol Total (LabTest, ref. 76-2/100) lido à 490 nm em espectrofotômetro, bem como Colesterol HDL (LabTest, ref. 13-50) lido à 500 nm e Triglicérides totais (LabTest, ref. 82-2/100) lido à 405 nm.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por teste *T Student* ou no caso de mais de duas variantes utilizou-se Análise de Variância (ANOVA de uma via com pós teste de Tukey). Em todos os resultados se adotou 5% como limite de significância estatística ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos na dosagem de glicose plasmática basal (Figura 1A), realizada anteriormente ao sacrifício das ratas, mostraram diminuição estatisticamente significativa desse parâmetro em ratas aos 19 dias de prenhez. Da mesma forma, o conteúdo de glicogênio hepático (Figura 1B) também se apresentou diminuído durante o período de prenhez, indicando um possível incremento na taxa de glicólise e glicogenólise nessa condição.

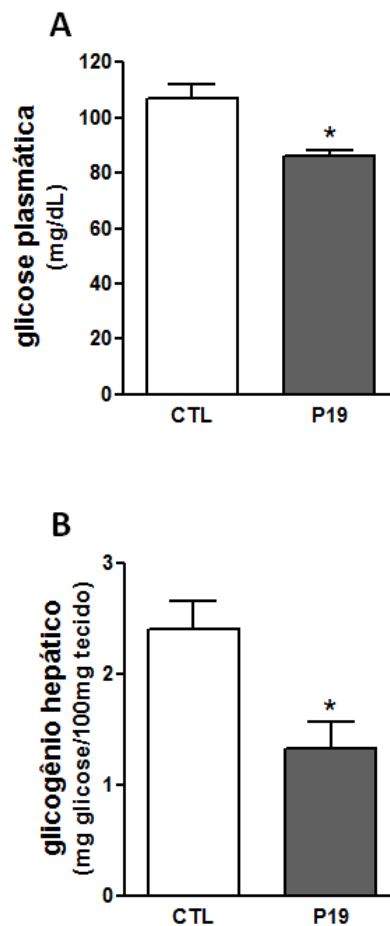


Figura 1. A. Glicose basal nas condições (CTL) e prenhez de 19 dias (P19). B. Conteúdo de glicogênio hepático nas mesmas condições. Os valores são resultados das médias \pm os erros padrões * $p < 0,05$ vs. CTL, $n=6$ (A) e 8 (B) por grupo experimental.

A estimativa da taxa de gliconeogênese no fígado desses animais foi realizada através de duas metodologias distintas: Produção de glicose após sobrecarga intraperitoneal de piruvato (Figura 2A) e perfusão hepática de piruvato *in situ* (Figura 2C). O piruvato foi utilizado porque é metabólito intermediário comum nas vias gliconeogênicas, sendo formado tanto a partir do lactato quanto a partir de aminoácidos e glicerol. Os resultados obtidos em ambos os protocolos mostraram menor produção de glicose (Figuras 2B e 2D) a partir do piruvato nas ratas prenhes.

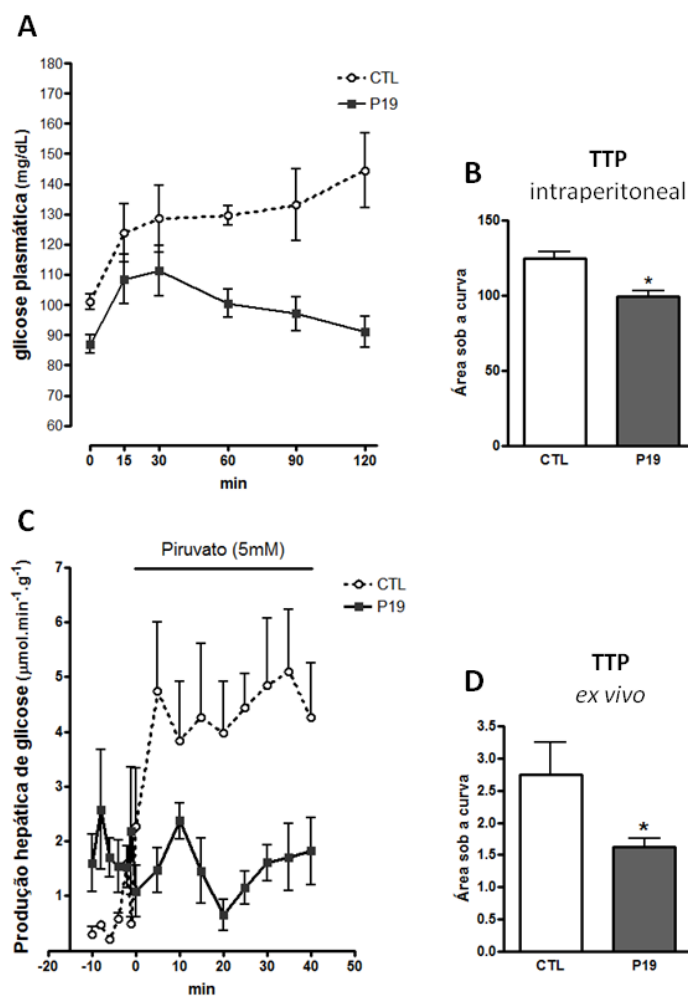


Figura 2. A. Variação da glicemia ao longo do tempo após injeção intraperitoneal de piruvato nas condições (CTL) e prenhe de 19 dias (P19), em B, área sob curva. Em C, variação da concentração de glicose no perfusado coletado do fígado ao longo do tempo após perfusão com piruvato em CTL e P19, em D, área sob a curva. Os valores são resultados das médias +/- os erros padrões * $p < 0,05$ vs. CTL, $n = 5$ (A) e 8 (B).

Anteriormente à realização da análise das proteínas de interesse, verificamos qual proteína constitutiva seria adequada para posterior normalização dos

resultados. A Figura 3 mostra que o conteúdo de β -actina não apresenta diferença entre os grupos experimentais avaliados.

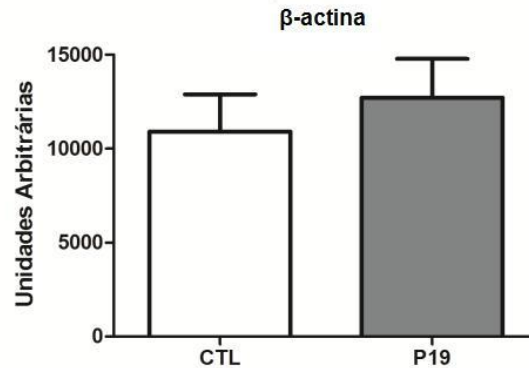


Figura 3. Conteúdo da proteína constitutiva β -actina nas condições (CTL) e prenhe de 19 dias (P19). Os valores são resultados das médias \pm os erros padrões * $p < 0,05$ vs. CTL, $n=8$ por grupo experimental.

Em paralelo a análise da via da AMPK hepática, avaliamos também proteínas-chave da via de sinalização da insulina, posto que as alterações desta via descritas na literatura ainda são contraditórias. O conteúdo de IR (Figura 4A) e substrato 2 do receptor de insulina, IRS-2 (Figura 4C) apresentaram diminuição na prenhez, enquanto que o IRS-1 (Figura 4B) não apresentou variação significativa. Já fosforilação em tirosina do IR após estímulo com insulina mostrou-se diminuída no fígado de ratas prenhes (Figura 4D).

A fosforilação em serina da AKT (Figura 5A) manteve a resposta aumentada à insulina na prenhez da mesma forma observada nas ratas controle, não havendo diferença quanto a esse parâmetro nos grupos estudados. A expressão da PEPCK, enzima classicamente regulada pela insulina, não foi alterada pela prenhez (Figura 5B e 5C).

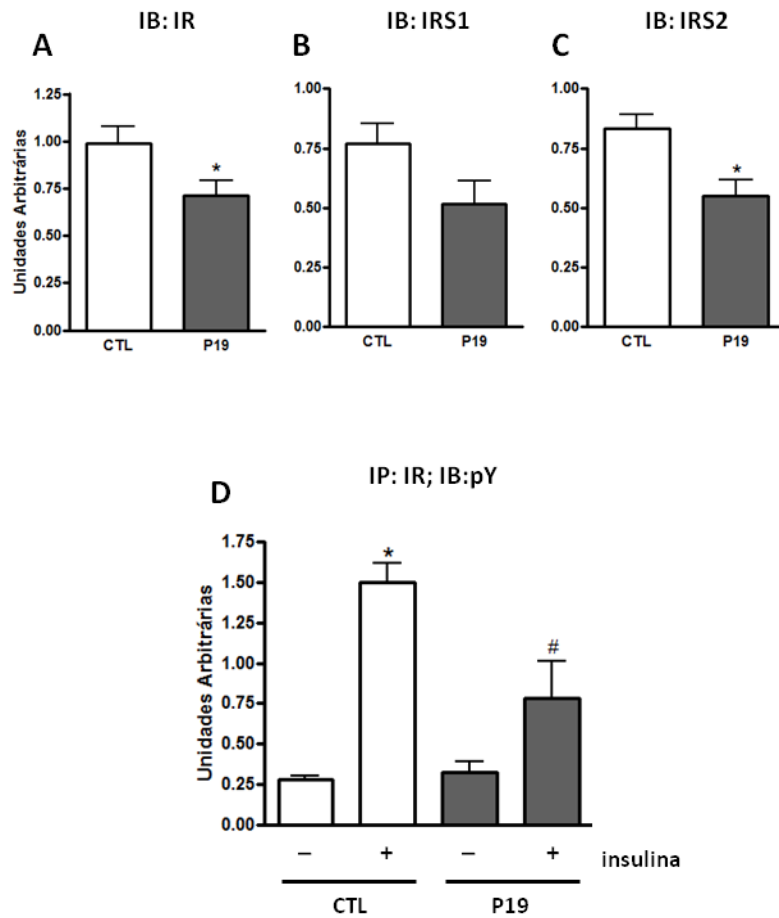


Figura 4. Conteúdo de IR (A), IRS-1 (B) e IRS-2 (C) nas condições (CTL) e prenhe de 19 dias (P19). Em D, imunoblotting com anticorpo anti-fosfo tirosina (pY) após imunoprecipitação do IR com (+) e sem (-) estímulo com insulina. Os valores são resultados das médias +/- os erros padrões * $p < 0,05$ vs. CTL, $n = 8$ por grupo experimental.

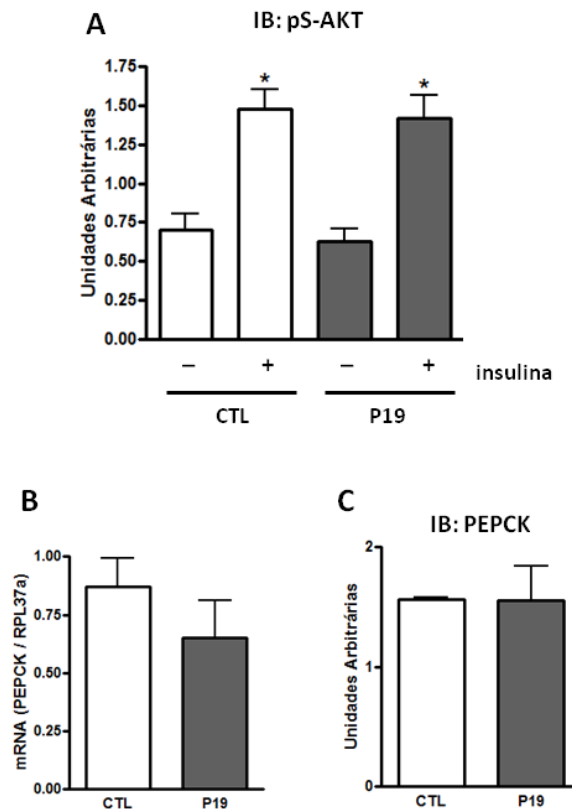


Figura 5. Fosforilação em serina da AKT (A) após estímulo com insulina (+) e em sua ausência, nas condições (CTL) e prenhe de 19 dias (P19). Em B, expressão gênica da PEPCK normalizada pelo gene constitutivo RPL37a e conteúdo protéico da PEPCK (C) nas mesmas condições. Os valores são resultados das médias +/- os erros padrões * $p < 0,05$ vs. CTL, $n = 7$, por grupo experimental.

Quanto às fosfatases no fígado, não houve alteração no conteúdo da proteína-tirosina fosfatase SHP2, (Figura 6A) nas prenhes em relação ao controle. Já a proteína PTP1B, tirosina fosfatase não transmembranica, aumentou nas ratas prenhes em relação às controle. (Figura 6B).

A imunoprecipitação com IR e imunoblotting para SHP2 (Figura 6C) mostrou que a associação entre essas proteínas, com e sem estímulo agudo com insulina, não se altera no final da prenhez em relação ao observado nas ratas controle. A imunoprecipitação com IR e imunoblotting para PTP1B (Figura 6D) mostrou que a

resposta à insulina em prenhes é significativamente maior que a resposta das ratas controle ao mesmo estímulo.

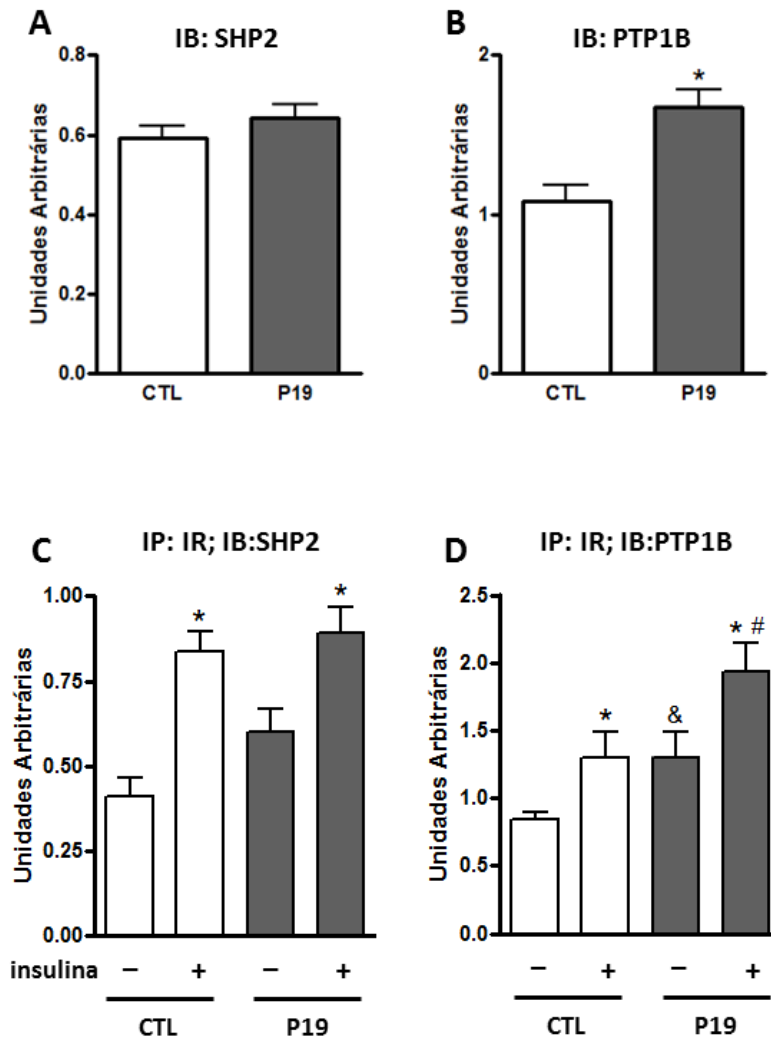


Figura 6. Conteúdo de SHP2 (A) e PTP1B (B) nas condições (CTL) e prenhe de 19 dias (P19). Em C, imunoblotting para SHP2 após imunoprecipitação com IR e estímulo com insulina (+) e em sua ausência (-). Em D, imunoblotting para de PTP1B após imunoprecipitação com IR e estímulo com insulina (+) e em sua ausência (-), nas mesmas condições. Os valores são resultados das médias +/- os erros padrões * $p < 0,05$ vs. o respectivo controle; & $p < 0,05$ vs. CTL sem estímulo (CTL -); # $p < 0,05$ vs. controle com estímulo (CTL+). N=5 e 6 por grupo experimental.

A proteína G6Pase, glicose-6-fosfatase, enzima-chave no metabolismo do glicogênio e que também está envolvida na glicogenólise (ARION; LANGE; WALLS, 1980) apresentou diminuição no conteúdo de proteína total (Figura 7A) e de sua

expressão gênica (Figura 7B) no fígado de ratas prenhes. A expressão da enzima fosfofrutoquinase, a PFK, também se mostrou diminuída de forma significativa em prenhes *versus* controle (Figura 7C).

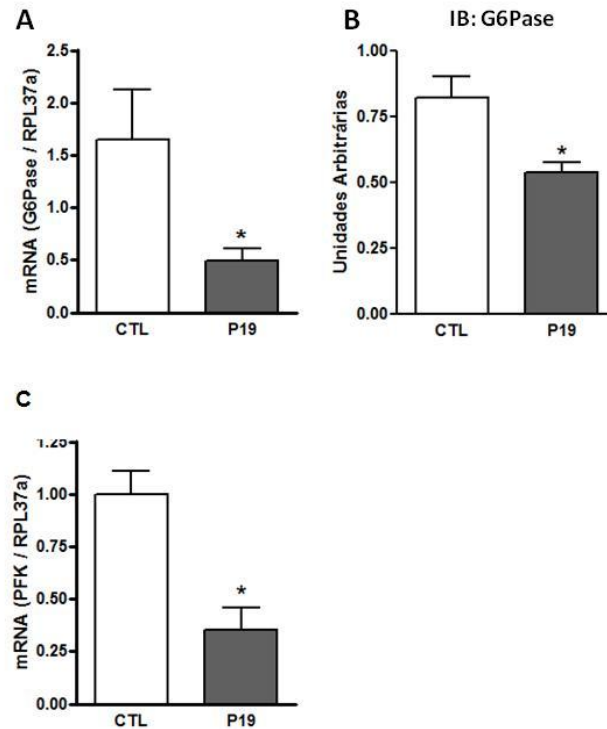


Figura 7. Expressão gênica da G6Pase normalizada pelo gene constitutivo RPL37a (A), conteúdo de G6Pase (B) nas condições (CTL) e prenhe de 19 dias (P19). Em C, expressão gênica da PFK normalizada pelo gene constitutivo RPL37a nas mesmas condições. Os valores são resultados das médias +/- os erros padrões * $p < 0,05$ vs. CTL, $n = 8$ por grupo experimental.

Na análise das proteínas relacionadas à via da AMPK, os resultados mostraram que o conteúdo de AMPK total (α ou 1/ β ou 2) (Figura 8A) apresenta diminuição significativa no animal prenhe. O fosforilação da subunidade α ou 1 da AMPK (Figura 8B), funcionalmente responsável pela ação quinase ativa dessa proteína, também apresenta diminuição no final da prenhez. O conteúdo de ACC (Figura 8C) apresenta tendência à diminuição rata prenhe, porém sem significância estatística, já a fosforilação da ACC (Figura 8D) diminui significativamente em prenhes em relação ao controle.

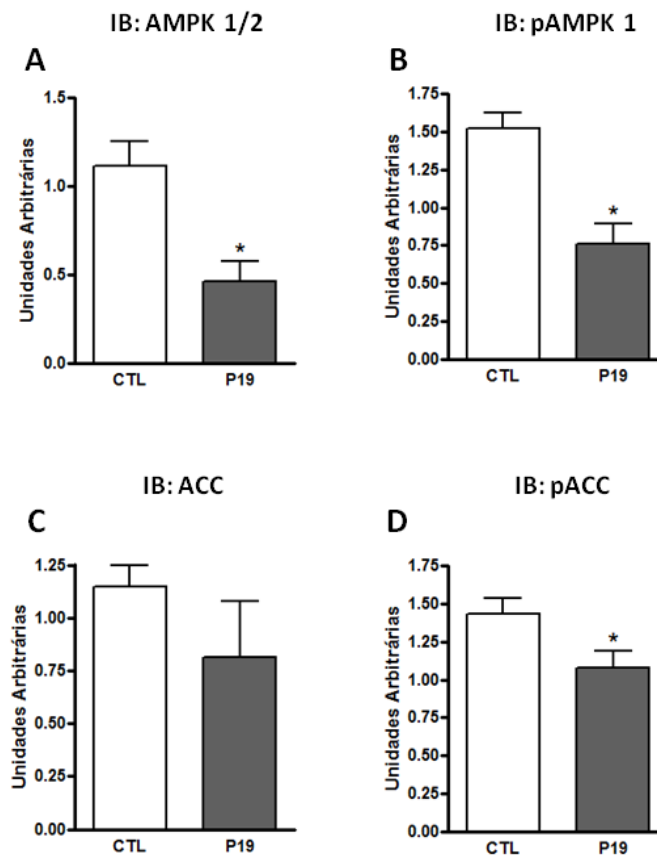


Figura 8. Conteúdo de AMPK (A), conteúdo da subunidade fosforilada α ou 1 da AMPK (B) nas condições (CTL) e prenhe de 19 dias (P19). Em C, conteúdo de ACC e, em D, conteúdo da ACC fosforilada nas mesmas condições. Os valores são resultados das médias +/- os erros padrões * $p < 0,05$ vs. CTL, $n = 5$ a 11 por grupo experimental.

A dosagem plasmática dos principais ácidos graxos circulantes mostrou aumento significativo na concentração de triglicérides circulantes nas ratas prenhes em relação ao controle (Figura 9A). As concentrações de colesterol total (Figura 9B) e colesterol HDL (Figura 9C) não se alteraram entre os grupos.

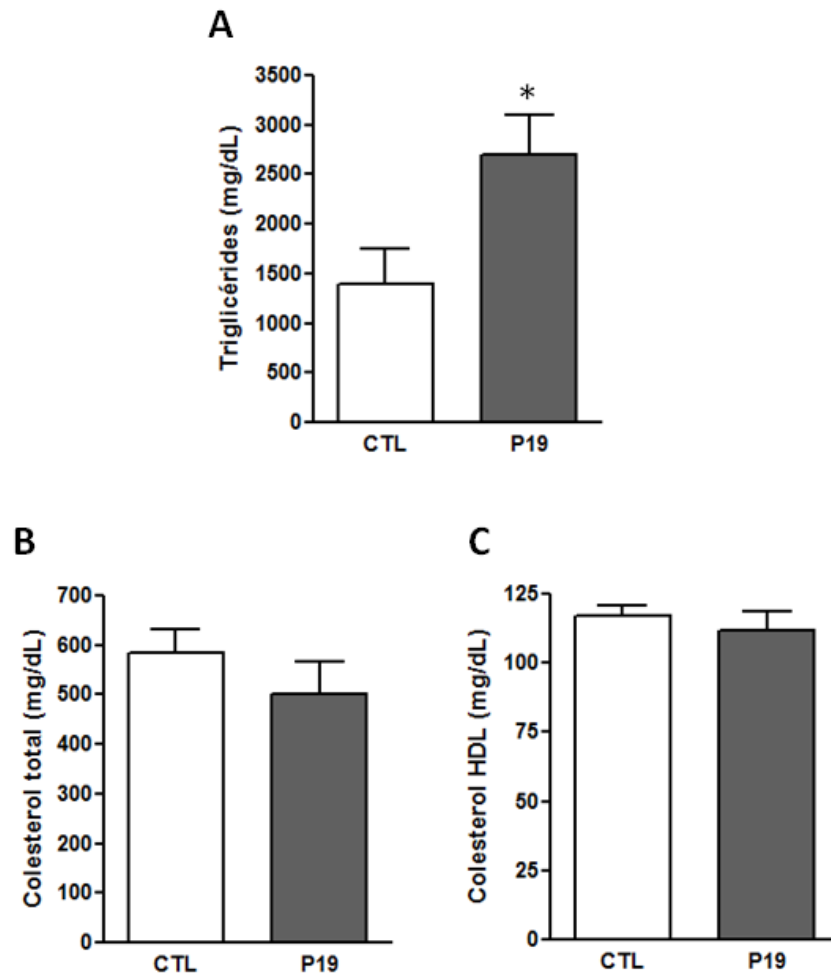


Figura 9. A. Triglicérides totais nas condições (CTL) e prenhe de 19 dias (P19). Em B, colesterol total e, em C, colesterol HDL nas mesmas condições. Os valores são resultados das médias +/- os erros padrões * $p < 0,05$ vs. CTL, $n = 6$ por grupo experimental.

Os resultados da cromatografia líquida de camada delgada, realizada a partir do extrato lipídico total obtido dos fígados dos animais, indicou não haver diferença entre os grupos prenhe e controle na maioria dos parâmetros analisados: Colesterol (Figura 10A), ácidos graxos livres (Figura 10B), ésteres de colesterol (Figura 10D), metil ésteres (Figura 10E) e fosfolipídeos (Figura 10F). No entanto, a concentração de triglicérides no fígado (Figura 10C) apontou diminuição nas ratas prenhes em relação às controle.

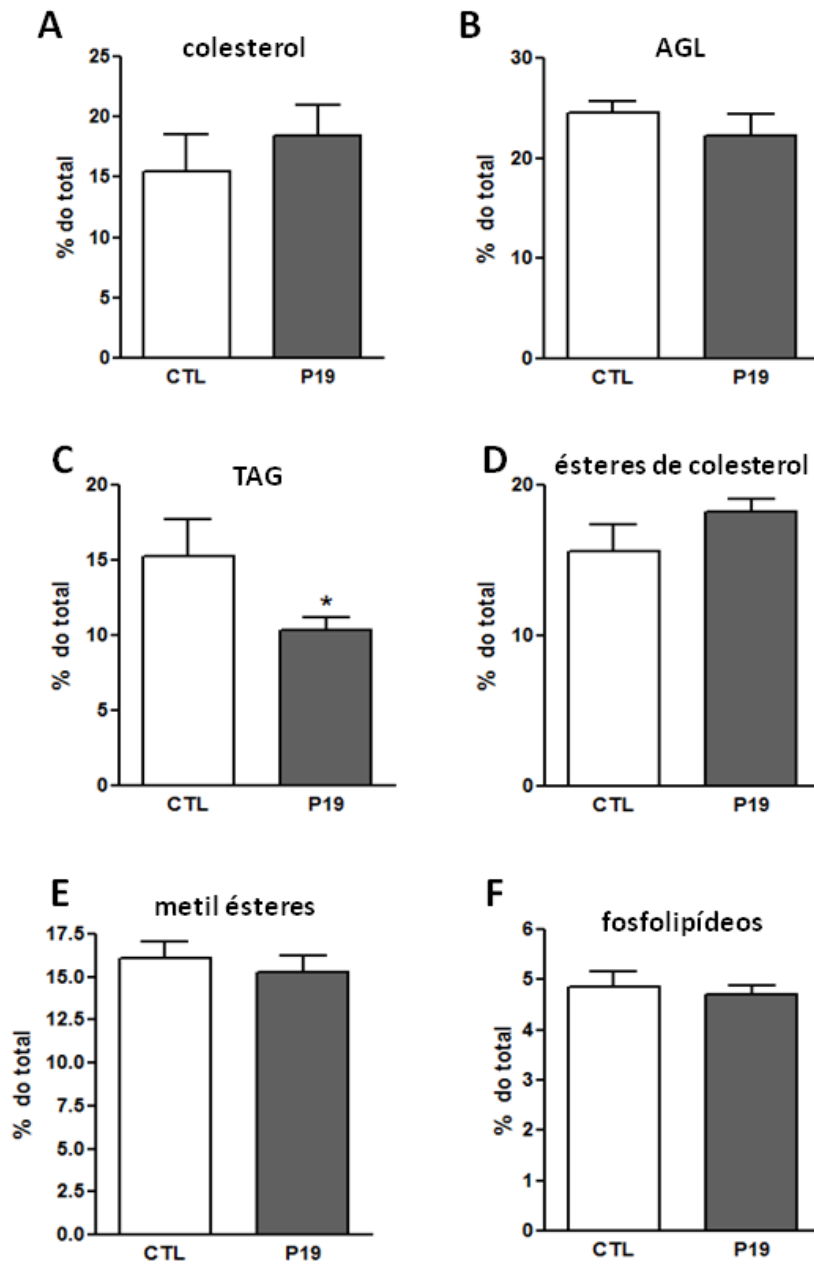


Figura 10. Colesterol (A), ácidos graxos livres (B) e triglicérides (C) nas condições (CTL) e prenhe de 19 dias (P19). Em D, ésteres de colesterol, metil ésteres (E) e fosfolipídeos (F) nas mesmas condições. Os valores são resultados das médias +/- os erros padrões * $p < 0,05$ vs. CTL, $n=6$ por grupo experimental.

A análise da expressão de alguns genes codificadores de proteínas-chave da síntese *de novo* de lipídeos mostrou que, no final da prenhez, a expressão da FAS

aumentou significativamente em relação às ratas virgens (Figura 11A). As três isoformas das enzimas málicas (MEs) avaliadas apresentaram redução na expressão (Figuras 11B, 11C e 11E), assim como a do receptor hepático intracelular LXR (Figura 11F) e do fator de transcrição SREBP1 (Figura 11G).

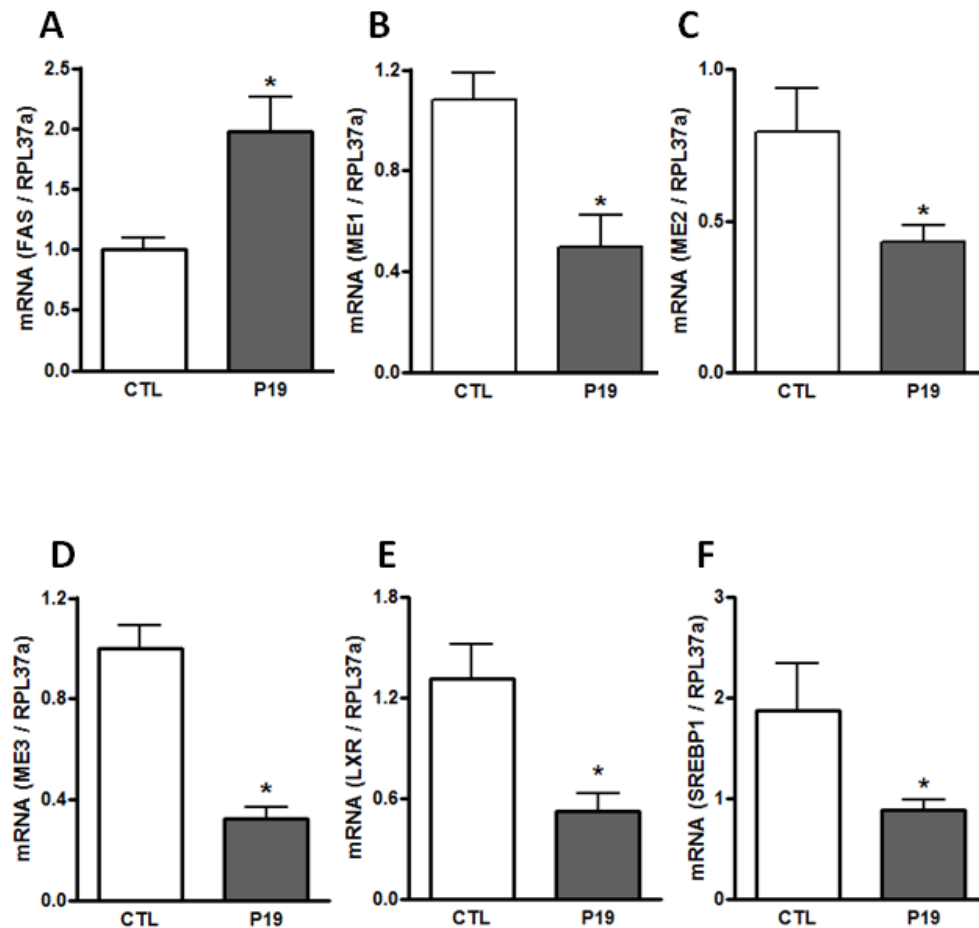


Figura 11. Expressão hepática de genes codificadores de proteínas envolvidas na síntese de novo de lipídeos. (A) sintase de ácidos graxos (FAS); (B, C e D) isoformas 1, 2 e 3 da enzima málica, respectivamente; (E) receptor nuclear hepático LXR; (F) fator de transcrição SREBP1. Os valores são resultados das médias \pm os erros padrões * $p < 0,05$ vs. CTL, $n=6$ por grupo experimental.

5 DISCUSSÃO

Durante o terceiro período de prenhez se observa redução da glicemia, aumento de triglicérides e colesterol circulantes e resistência periférica à insulina. A participação do fígado na regulação da homeostasia energética da prenhez tem sido investigada há décadas, mas até o momento não está completamente esclarecida. Ademais, os mecanismos moleculares envolvidos foram pouco explorados. Neste trabalho buscamos esclarecer alguns aspectos do metabolismo energético do fígado de ratas prenhes, em especial aos relacionados ao metabolismo da glicose e dos lipídeos.

A diminuição da glicemia no período final de prenhez da rata denota a maior demanda de glicose para o conceito, de acordo com dados publicados na literatura. Leturque e colaboradores já haviam observado que no final da prenhez a taxa de utilização de glicose pelo conceito aumenta, representando aproximadamente 30% da utilização total de glicose pelo organismo materno (LETURQUE et al., 1986). Desta forma, é aceitável que a redução do conteúdo de glicogênio observado seja consequência das necessidades maternas de manutenção de glicemia adequada, a despeito da maior secreção de insulina característica deste período da prenhez (ANHE et al., 2007).

Foi proposto anteriormente que ratas prenhes a termo apresentam gliconeogênese e glicogenólise aumentadas e redução da lipogênese, a despeito dos níveis elevados de insulina, indicando um estado de resistência à ação desse hormônio (MARTINEZ et al., 1989). Essa hipótese se baseia nos seguintes achados: (a) redução da taxa de autofosforilação e da incorporação máxima de ^{32}P na subunidade beta do receptor de insulina (MARTINEZ et al., 1989); (b) redução da sensibilidade à insulina, determinada por *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico, e aumento da adiposidade visceral (EINSTEIN et al., 2008); (c) redução do IRS1 e de sua associação com a PI3K (SAAD et al., 1997). Por outro lado, um estudo mais recente e detalhado, que examinou a sensibilidade à insulina em modelo com elevações fisiológicas da insulina durante o *clamp* em cães prenhes e não prenhes,

não indicou diferença na sensibilidade ao hormônio (CONNOLLY et al., 2007). Esses autores justificam que as diferenças entre os estudos se deve a utilização de concentrações de insulina menores que a encontrada no 3º período de prenhez, e/ou altas taxas de infusão do hormônio, que dificulta a análise da resposta hepática isolada. Nossos experimentos de teste de tolerância ao piruvato também mostraram que a produção hepática de glicose não está aumentada nas ratas prenhes. A possibilidade desse efeito representar desvio do piruvato para a unidade feto-placentária é descartada pelos resultados obtidos nos experimentos de perfusão do fígado *in situ*. Além disso, a menor expressão de G6Pase deve resultar em menor efluxo de glicose hepática. Vale aqui ressaltar que a menor taxa de gliconeogênese das ratas prenhes pode representar a utilização preferencial do piruvato em outras vias metabólicas. Essa hipótese será discutida mais adiante.

A sensibilidade do IR à insulina apresentou-se diminuída, confirmando dados da literatura (SAAD et al., 1997). A redução da fosforilação do IR pode ser explicada pelo aumento do conteúdo e da associação da PTP1B ao IR. PTP1B exerce efeitos negativos sobre a sinalização da insulina, mediados pela desfosforilação do IR e dos IRSs (GUM et al., 2003; XIE et al., 2003). Já foi demonstrado que camundongos que não expressam PTP1B apresentam maior sensibilidade à insulina (ELCHEBLY et al., 1999). Também, a diminuição da expressão do IR pode ser um fator adicional à reduzida resposta a insulina exógena. Por fim, é sabido que a ilhota materna tem um ganho de função no último período da prenhez, que se caracteriza por aumento da massa e da sensibilidade a glicose (SORENSEN; BRELJE, 1997). Em outras palavras, o final da gestação/prenhez, tanto de mulheres como de animais experimentais, é caracterizado por um quadro de hiperinsulinemia, que poderia resultar na redução do número e da auto-fosforilação do IR induzida pela insulina, como previamente demonstrada em fígado de animais resistentes à insulina (DOMINICI et al., 1998).

Curiosamente a fosforilação da AKT no fígado de ratas prenhes foi mantida em níveis semelhantes aos animais controle. A manutenção da expressão e conteúdo da PEPCK, alvo clássico da AKT, concorda com esses resultados. O conjunto de experimentos realizados é insuficiente para explicar esse fenômeno. Entretanto, pode-se especular que o meio interno da rata prenhe se constitui de uma complexa combinação de hormônios, citocinas e nutrientes. Já é bem conhecido que AKT não

é um mediador intracelular exclusivo da via de sinalização da insulina, mas sim compartilhada por inúmeros sinais extracelulares, por exemplo, a prolactina (AMARAL et al., 2004).

Na tentativa de entender qual o destino preferencial do piruvato no fígado das ratas prenhes foram avaliadas as expressões de algumas proteínas chave do metabolismo energético.

A 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bisfosfatase hepática (PFK-L) é uma enzima que catalisa a síntese e degradação de frutose-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂), um potente ativador alostérico da 6-fosfofruto-1-quinase e inibidor da frutose-1,6-bisfosfatase. Devido à sua ação sobre essas duas enzimas, Fru-2,6-P₂ funciona como regulador dos fluxos glicolítico e gliconeogênico. A fosforilação da PFK-L mediada pela proteína quinase A (PKA) inibe sua atividade quinase e estimula sua atividade fosfatase, resultando na degradação da Fru-2,6-P₂ (NAKAJIMA et al., 1995). Assim, em situações em que há aumento de cAMP, como jejum e diabetes, o conteúdo de Fru-2,6-P₂ é baixo e a gliconeogênese é favorecida. Em situações em que a insulina circulante é alta, a PFK-L fosforilada é predominante, resultando na formação de Fru-2,6-P₂ e conseqüente desvio para a glicólise.

Além da regulação hormonal de sua atividade, a expressão da PFK-L também é regulada pela insulina e seus contra-reguladores. A realimentação com dieta rica em carboidratos após jejum prolongado e a administração de insulina em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, promovem aumento do conteúdo de mRNA da PFK-L (COLOSIA et al., 1988). Esses achados parecem se opor aos nossos resultados, já que ratas prenhes, conhecidamente hiperinsulinêmicas, apresentaram redução da expressão de PFK-L. Entretanto, os efeitos da insulina são dependentes da presença de glicose (CIFUENTES et al., 1991), que está diminuída no sangue de ratas prenhes. Além disso, se a concentração de Fru-2,6-P₂ é determinada pelas duas reações opostas catalizadas pela PFK-L, um aumento na quantidade total da enzima não deve alterar a concentração de Fru-2,6-P₂. Assim, parece que no ciclo de jejum/realimentação e na administração de insulina em ratos diabéticos há necessidade de moléculas adicionais da enzima, assim como alterações no seu estado de fosforilação. Considerando seu comportamento adaptativo, a PFK-L se comporta mais como enzima lipogênica do que enzima gliconeogênica: sua

atividade diminui no jejum e no diabetes e tanto sua atividade quanto o conteúdo de mRNA aumentam após realimentação ou administração de insulina.

Em várias espécies, inclusive a humana, o aumento de triglicérides e colesterol séricos no final da gestação/prenhez são resultado do aumento de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) e LDL (lipoproteína de baixa densidade) circulantes (SALAMEH; MASTROGIANNIS, 1994; HERRERA, 2000; 2002). Vários fatores contribuem para o aumento de lipídeos circulantes. Primeiro, a atividade da lipase lipoprotéica do tecido adiposo diminui (HERRERA et al., 1991), que resulta em redução da depuração de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Segundo, no tecido adiposo de ratas prenhes a síntese de triglicerídeos diminui e a lipólise aumenta, o que aumenta os níveis de ácidos graxos circulantes (HERRERA et al., 1991). Por fim, a prenhez reduz a oxidação hepática de ácidos graxos (GRIMBERT et al., 1993), mesmo com aumento da síntese (ZIMMERMANN; HUMMEL, 1978; GRIMBERT et al., 1993). O aumento da síntese *de novo* hepática e da liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo, acoplada à redução de sua oxidação, aumenta o *pool* de ácidos graxos disponíveis para a síntese hepática de triglicerídeos (WASFI; WEINSTEIN; HEIMBERG, 1980).

Em nossos ensaios funcionais utilizamos piruvato para avaliação da gliconeogênese. Piruvato é metabólito comum dos principais precursores utilizados na gliconeogênese (lactato, aminoácidos e glicerol). Porém, o destino do piruvato é variável, dependendo do tipo celular e potencial energético da célula. Para a gliconeogênese, a carboxilação do piruvato a oxaloacetato, e a redução deste último a malato, (ambas reações mitocondriais), permite que o substrato retorne ao citossol, seja reoxidado para formar fosfoenolpiruvato, catalizada pela PEPCK. Outro destino do piruvato é a síntese de Acetil-CoA na mitocôndria.

O Acetil –CoA pode ser oxidado para geração de ATP (adenosina trifosfato). Quando a célula tem grande quantidade de ATP e NADH + H⁺, estes reduzem o fluxo no ciclo de Krebs por inibição da isocitrato desidrogenase. O acúmulo de isocitrato e citrato na mitocôndria promove o fluxo deste último para o citossol, em que pode ser: (1) clivado pela citrato liase em oxaloacetato e Acetil-CoA; este último é o precursor da síntese de ácidos graxos; (2) ativar a ACC, enzima reguladora da síntese de ácidos graxos; e (3) exercer regulação alostérica sobre a PFK,

redirecionando os metabólitos para a via da pentose fosfato e, finalmente, para a síntese de ácidos graxos.

Outras evidências que fortalecem a hipótese de desvio do substrato para síntese *de novo* de lipídeos são o aumento da expressão da FAS e a redução das enzimas málicas (MEs). FAS catalisa a conversão de malonil CoA em palmitato, aumentando assim a síntese *de novo* de ácidos graxos (UYEDA; YAMASHITA; KAWAGUCHI, 2002). MEs catalisam a formação de piruvato a partir de malato; assim, logo, a redução da expressão gênica das enzimas málicas deve refletir em aumento do conteúdo de malato no citossol e, como mencionado anteriormente, o aumento de metabólitos para a síntese de ácidos graxos. A transcrição das MEs pode ser reprimida pela insulina, mediada pelo fator de transcrição Egr-1 (*early growth response-1*) (BARROSO; SANTISTEBAN, 1999), o que reforça nossa hipótese de ausência de prejuízo da sinalização da insulina sobre o metabolismo energético hepático na prenhez.

A expressão de genes envolvidos no processo de lipogênese hepática já foi avaliada em murídeos no 19º dia de prenhez (SWEENEY et al., 2006). Nesse trabalho os autores observaram diminuição da expressão de LXR e SREBP1, resultados esses confirmados em nosso estudo com ratas prenhes. Sabe-se que o metabolismo e efluxo de colesterol no fígado são regulados pelos LXR, que também regulam a absorção geral de lipídeos (SZANTO; ROSZER, 2008). A expressão menor de LXR em prenhes, comparativamente ao controle, se relaciona diretamente à expressão também diminuída da SREBP1 cuja transcrição é diretamente regulada pelo LXR (STOECKMAN; TOWLE, 2002). Um estudo recente mostrou que a estimulação farmacológica do LXR aumenta a síntese de triglicérides e sua incorporação em partículas de VLDL muito grandes, iguais ou maiores que quilomícrons (OKAZAKI et al., 2010), resultando num quadro de hipertrigliceridemia. A relevância dos nossos achados ainda necessita de experimentos adicionais para ser esclarecida.

Considerando a ausência de alterações significativas na via de sinalização da insulina, avaliamos a participação da via da AMPK nas adaptações metabólicas do fígado de ratas prenhes.

A AMPK foi descoberta como enzima chave do transporte de glicose independente de insulina no músculo esquelético. Uma vez ativada por fosforilação, AMPK estimula vias que geram o aumento de ATP, tais como a oxidação de ácidos graxos, ao mesmo tempo em que desativa as vias que consomem o ATP, como a síntese de ácidos graxos (SIMONEAU et al., 1999). No fígado, a primeira ação identificada da AMPK foi a capacidade de inibir, por meio de fosforilação, a atividade da ACC e da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR), o que claramente implica em uma função importante na regulação da síntese de ácidos graxos e colesterol (HENIN et al., 1995). Além disso, AMPK regula a produção hepática de glicose por modulação da expressão de enzimas gliconeogênicas como a G6Pase e a PEPCK (SHAW et al., 2005). Nossos resultados mostraram que a atividade da AMPK está reduzida durante a prenhez, o que repercutiu em redução da expressão de G6Pase e da fosforilação da ACC. Assim, é provável que a gliconeogênese esteja de fato diminuída em consequência do redirecionamento do metabolismo hepático para síntese de ácidos graxos, mediada pela via da AMPK e não pela via da insulina.

Concordante com a literatura, verificamos aumento dos níveis de triglicérides circulantes. Este foi acompanhado de diminuição do conteúdo hepático de triglicérides, o que aponta para um aumento no efluxo hepático de VLDL.

6 CONCLUSÕES

Sob o ponto de vista metabólico, parece não ocorrer resistência à insulina no fígado de ratas prenhes, posto que a fosforilação da AKT e a expressão da PEPCK não foram alteradas e a inibição da expressão das MEs foi mantida.

A redução da produção hepática de glicose frente ao estímulo com piruvato, associada a (a) resposta normal à insulina; (b) expressão de enzimas lipogênicas; e (c) atividade da via AMPK/ACC indicam que a atividade metabólica do fígado de ratas prenhes é preferencialmente dirigida à síntese *de novo* de lipídeos e não à gliconeogênese como previamente proposto.

REFERÊNCIAS*

AMARAL, M. E.; CUNHA, D. A.; ANHE, G. F.; UENO, M.; CARNEIRO, E. M.; VELLOSO, L. A.; BORDIN, S.; BOSCHERO, A. C. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. **J. Endocrinol.**, v. 183, n. 3, p. 469-476, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Type 2. Disponível em: <www.diabetes.org/diabetes-sics/diabetesstatistics/>. Acesso em: 15 nov. 2010.

ANHE, G. F.; HIRABARA, S. M.; TURRER, T. C.; CAPERUTO, L. C.; ANHE, F. F.; RIBEIRO, L. M.; MARCAL, A. C.; CARVALHO, C. R.; CURI, R.; MACHADO, U. F.; BORDIN, S. Postpartum glycemic homeostasis in early lactating rats is accompanied by transient and specific increase of soleus insulin response through IRS2/AKT pathway. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, n. 6, p. R2225-R2233, 2007.

ARAD, M.; BENSON, D. W.; PEREZ-ATAYDE, A. R.; MCKENNA, W. J.; SPARKS, E. A.; KANTER, R. J.; MCGARRY, K.; SEIDMAN, J. G.; SEIDMAN, C. E. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. **J. Clin. Invest.**, v. 109, n. 3, p. 357-362, 2002.

ARION, W. J.; LANGE, A. J.; WALLS, H. E. Microsomal membrane integrity and the interactions of phlorizin with the glucose-6-phosphatase system. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n. 21, p. 10387-10395, 1980.

BARROSO, I.; SANTISTEBAN, P. Insulin-induced early growth response gene (Egr-1) mediates a short term repression of rat malic enzyme gene transcription. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 25, p. 17997-18004, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUSS, M. D.; ARIAS, E. B.; LIENHARD, G. E.; CARTEE, G. D. Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 41-50, 2005.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHEUNG, P. C.; SALT, I. P.; DAVIES, S. P.; HARDIE, D. G.; CARLING, D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. **Biochem. J.**, v. 346, pt. 3, p. 659-669, 2000.

CIFUENTES, M. E.; ESPINET, C.; LANGE, A. J.; PILKIS, S. J.; HOD, Y. Hormonal control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression in rat hepatoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 3, p. 1557-1563, 1991.

COLOSIA, A. D.; MARKER, A. J.; LANGE, A. J.; EL-MAGHRABI, M. R.; GRANNER, D. K.; TAULER, A.; PILKIS, J.; PILKIS, S. J. Induction of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA by refeeding and insulin. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 35, p. 18669-18677, 1988.

CONNOLLY, C. C.; PAPA, T.; SMITH, M. S.; LACY, D. B.; WILLIAMS, P. E.; MOORE, M. C. Hepatic and muscle insulin action during late pregnancy in the dog. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, n. 1, p. R447-R452, 2007.

CORTON, J. M.; GILLESPIE, J. G.; HARDIE, D. G. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. **Curr. Biol.**, v. 4, n. 4, p. 315-324, 1994.

DE FRONZO, R.; MIKI, E.; STEINKE, J. [Diabetic syndrome in sand rats. 3. Observations on adipose tissue and liver in the non-diabetic stage]. **Diabetologia**, v. 3, n. 2, p. 140-142, 1967.

DELZENNE, N.; FERRE, P.; BEYLOT, M.; DAUBIOUL, C.; DECLERCQ, B.; DIRAISON, F.; DUGAIL, I.; FOUFELLE, F.; FORETZ, M.; MACE, K.; REIMER, R.; PALMER, G.; RUTTER, G.; TAVARE, J.; VAN LOO, J.; VIDAL, H. Study of the regulation by nutrients of the expression of genes involved in lipogenesis and obesity in humans and animals. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 11, p. 118-121, n. 4, 2001. Suppl.

DENIS, R. G.; WILLIAMS, G.; VERNON, R. G. Regulation of serum leptin and its role in the hyperphagia of lactation in the rat. **J. Endocrinol.**, v. 176, n. 2, p. 193-203, 2003.

DOMINICI, F. P.; BALBIS, A.; BARTKE, A.; TURYN, D. Role of hyperinsulinemia on hepatic insulin receptor concentration and autophosphorylation in the presence of high growth hormone levels in transgenic mice overexpressing growth hormone gene. **J. Endocrinol.**, v. 159, n. 1, p. 15-25, 1998.

EINSTEIN, F. H.; FISHMAN, S.; MUZUMDAR, R. H.; YANG, X. M.; ATZMON, G.; BARZILAI, N. Accretion of visceral fat and hepatic insulin resistance in pregnant rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 294, n. 2, p. E451-E455, 2008.

ELCHEBLY, M.; PAYETTE, P.; MICHALISZYN, E.; CROMLISH, W.; COLLINS, S.; LOY, A. L.; NORMANDIN, D.; CHENG, A.; HIMMS-HAGEN, J.; CHAN, C. C.; RAMACHANDRAN, C.; GRESSER, M. J.; TREMBLAY, M. L.; KENNEDY, B. P. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1544-1548, 1999.

FERRE, P.; BURNOL, A. F.; LETURQUE, A.; TERRETAZ, J.; PENICAUD, L.; JEANRENAUD, B.; GIRARD, J. Glucose utilization in vivo and insulin-sensitivity of rat brown adipose tissue in various physiological and pathological conditions. **Biochem. J.**, v. 233, n. 1, p. 249-252, 1986.

GONZALEZ, C.; ALONSO, A.; FERNANDEZ, R.; PATTERSON, A. M. Regulation of insulin receptor substrate-1 in the liver, skeletal muscle and adipose tissue of rats throughout pregnancy. **Gynecol. Endocrinol.**, v. 17, n. 3, p. 187-197, 2003.

GRIMBERT, S.; FROMENTY, B.; FISCH, C.; LETTERON, P.; BERSON, A.; DURAND-SCHNEIDER, A. M.; FELDMANN, G.; PESSAYRE, D. Decreased mitochondrial oxidation of fatty acids in pregnant mice: possible relevance to development of acute fatty liver of pregnancy. **Hepatology**, v. 17, n. 4, p. 628-637, 1993.

GUM, R. J.; GAEDE, L. L.; KOTERSKI, S. L.; HEINDEL, M.; CLAMPIT, J. E.; ZINKER, B. A.; TREVILLYAN, J. M.; ULRICH, R. G.; JIROUSEK, M. R.; RONDINONE, C. M. Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 21-28, 2003.

HARDIE, D. G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? **Eur. J. Biochem.**, v. 246, n. 2, p. 259-273, 1997.

HAUGUEL-DE MOUZON, S. E. A. Alteration of phosphotyrosine phosphatase activity in tissues from diabetic and pregnant rats. **Endocrinology**, v. 132, p. 67-74, 1993.

HAWLEY, S. A.; DAVISON, M.; WOODS, A.; DAVIES, S. P.; BERI, R. K.; CARLING, D.; HARDIE, D. G. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 44, p. 27879-27887, 1996.

HENIN, N.; VINCENT, M. F.; GRUBER, H. E.; VAN DEN BERGHE, G. Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. **FASEB J.**, v. 9, n. 7, p. 541-546, 1995.

HERRERA, E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 54, p. S47-S51, 2000. Suppl 1.

HERRERA, E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v. 19, n. 1, p. 43-55, 2002.

HERRERA, E.; KNOPP, R. H.; FREINKEL, N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis, and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat. **J. Clin. Invest.**, v. 48, n. 12, p. 2260-2272, 1969.

HERRERA, E.; LASUNCION, M. A.; PALACIN, M.; ZORZANO, A.; BONET, B. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. **Diabetes**, v. 40, p. 83-88, 1991. Suppl 2.

HORNES, P. J. On the decrease of glucose tolerance in pregnancy: studies of gastro-entero-pancreatic hormones and cortisol. **Dan. Med. Bull.**, v. 32, n. 2, p. 79-86, 1985.

HOUSSAY, B. A.; FOGLIA, V. G.; RODRIGUEZ, R. R. Production or prevention of some types of experimental diabetes by oestrogens or corticosteroids. **Acta Endocrinol. (Copenh)**, v. 17, n. 1-4, p. 146-164, 1954.

KILGOUR, E.; VERNON, R. G. Tissue-specific changes in the ability of insulin and noradrenaline to activate pyruvate dehydrogenase in vivo during lactation in the rat. **Biochem. J.**, v. 243, n. 1, p. 69-74, 1987.

KROOK, A.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; ZIERATH, J. R. Sending the signal: molecular mechanisms regulating glucose uptake. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 36, n. 7, p. 1212-1217, 2004.

LETURQUE, A.; FERRE, P.; BURNOL, A. F.; KANDE, J.; MAULARD, P.; GIRARD, J. Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. **Diabetes**, v. 35, n. 2, p. 172-177, 1986.

LONG, Y. C.; ZIERATH, J. R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 7, p. 1776-1783, 2006.

MAHLAPUU, M.; JOHANSSON, C.; LINDGREN, K.; HJALM, G.; BARNES, B. R.; KROOK, A.; ZIERATH, J. R.; ANDERSSON, L.; MARKLUND, S. Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 286, n. 2, p. E194-E200, 2004.

MARTINEZ, C.; RUIZ, P.; ANDRES, A.; SATRUSTEGUI, J.; CARRASCOSA, J. M. Tyrosine kinase activity of liver insulin receptor is inhibited in rats at term gestation. **Biochem. J.**, v. 263, n. 1, p. 267-272, 1989.

NAISMITH, D. J.; MORGAN, B. L. The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. **Br. J. Nutr.** v. 36, n. 3, p. 563-566, 1976.

NAKAJIMA, H.; HAMAGUCHI, T.; YAMASAKI, T.; TARUI, S. Phosphofructokinase deficiency: recent advances in molecular biology. **Muscle Nerve**, v. 3, p. S28-S34, 1995.

NOLAN, C. J.; PROIETTO, J. The set point for maternal glucose homeostasis is lowered during late pregnancy in the rat: the role of the islet beta-cell and liver. **Diabetologia**, v. 39, n. 7, p. 785-792, 1996.

OKAZAKI, H.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; LIANG, G. LXR-SREBP-1c-phospholipid transfer protein axis controls very low density lipoprotein (VLDL) particle size. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 9, p. 6801-6810, 2010.

PARKS, E. J. Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations. **Br. J. Nutr.**, v. 87, p. S247-S253, 2002. Suppl 2.

POSTIC, C.; DENTIN, R.; GIRARD, J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. **Diabetes Metab.**, v. 30, n. 5, p. 398-408, 2004.

ROSSI, G.; SHERWIN, R. S.; PENZIAS, A. S.; LAPACZEWSKI, P.; JACOB, R. J.; SHULMAN, G. I.; DIAMOND, M. P. Temporal changes in insulin resistance and secretion in 24-h-fasted conscious pregnant rats. **Am. J. Physiol.**, v. 265, n. 6, pt. 1, p. E845-E851, 1993.

RUDERMAN, N.; PRENTKI, M. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 4, p. 340-351, 2004.

RUDERMAN, N. B.; CACICEDO, J. M.; ITANI, S.; YAGIHASHI, N.; SAHA, A. K.; YE, J. M.; CHEN, K.; ZOU, M.; CARLING, D.; BODEN, G.; COHEN, R. A.; KEANEY, J.; KRAEGEN, E. W.; IDO, Y. Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase (AMPK): possible links between insulin resistance in muscle and early endothelial cell damage in diabetes. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, pt. 1, p. 202-206, 2003.

SAAD, M. J. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 4, p. 941-957, 1994.

SAAD, M. J.; MAEDA, L.; BRENELLI, S. L.; CARVALHO, C. R.; PAIVA, R. S.; VELLOSO, L. A. Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. **Diabetologia**, v. 40, n. 2, p. 179-186, 1997.

SALAMEH, W. A.; MASTROGIANNIS, D. S. Maternal hyperlipidemia in pregnancy. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 37, n. 1, p. 66-77, 1994.

SHAW, R. J.; LAMIA, K. A.; VASQUEZ, D.; KOO, S. H.; BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A.; MONTMINY, M.; CANTLEY, L. C. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. **Science**, v. 310, n. 5754, p. 1642-1646, 2005.

SIMONEAU, J. A.; VEERKAMP, J. H.; TURCOTTE, L. P.; KELLEY, D. E. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. **FASEB J.**, v. 13, n. 14, p. 2051-2060, 1999.

SMITH, A. C.; BRUCE, C. R.; DYCK, D. J. AMP kinase activation with AICAR simultaneously increases fatty acid and glucose oxidation in resting rat soleus muscle. **J. Physiol.**, v. 565, pt. 2, p. 537-546, 2005.

SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. **Front Neuroendocrinol.**, v. 23, n. 3, p. 225-256, 2002.

SORENSEN, R. L.; BRELJE, T. C. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. **Horm. Metab. Res.**, v. 29, n. 6, p. 301-307, 1997.

STOECKMAN, A. K.; TOWLE, H. C. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 30, p. 27029-27035, 2002.

SWEENEY, T. R.; MOSER, A. H.; SHIGENAGA, J. K.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K. R. Decreased nuclear hormone receptor expression in the livers of mice in late pregnancy. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 290, n. 6, p. E1313-E1320, 2006.

SZANTO, A.; ROSZER, T. Nuclear receptors in macrophages: a link between metabolism and inflammation. **FEBS Lett.**, v. 582, n. 1, p. 106-116, 2008.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 7, n. 2, p. 85-96, 2006.

TOMBES, R. M.; FAISON, M. O.; TURBEVILLE, J. M. Organization and evolution of multifunctional Ca(2+)/CaM-dependent protein kinase genes. **Gene**, v. 322, p. 17-31, 2003.

ULVEN, S. M.; DALEN, K. T.; GUSTAFSSON, J. A.; NEBB, H. I. LXR is crucial in lipid metabolism. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.**, v. 73, n. 1, p. 59-63, 2005.

UYEDA, K.; YAMASHITA, H.; KAWAGUCHI, T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, n. 12, p. 2075-2080, 2002.

VARDANEGA-PEICHER, M.; CURI, R.; PAGLIARINI E SILVA, S.; NASCIMENTO, K. F.; BAZOTTE, R. B. Responsiveness of glycogen breakdown to cyclic AMP in perfused liver from rats with insulin-induced hypoglycemia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 1, p. 45-51, 2003.

VIOLLET, B.; GUIGAS, B.; LECLERC, J.; HEBRARD, S.; LANTIER, L.; MOUNIER, R.; ANDREELLI, F.; FORETZ, M. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. **Acta Physiol. (Oxf.)**, v. 196, n. 1, p. 81-98, 2009.

WASFI, I.; WEINSTEIN, I.; HEIMBERG, M. Hepatic metabolism of [1-14C]oleate in pregnancy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 619, n. 3, p. 471-481, 1980.

XIE, L.; LEE, S. Y.; ANDERSEN, J. N.; WATERS, S.; SHEN, K.; GUO, X. L.; MOLLER, N. P.; OLEFSKY, J. M.; LAWRENCE, D. S.; ZHANG, Z. Y. Cellular effects of small molecule PTP1B inhibitors on insulin signaling. **Biochemistry**, v. 42, n. 44, p. 12792-12804, 2003.

YAO, X. H.; NYOMBA, B. L. Hepatic insulin resistance induced by prenatal alcohol exposure is associated with reduced PTEN and TRB3 acetylation in adult rat offspring. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 294, n. 6, p. R1797-R1806, 2008.

ZIERATH, J. R.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. **Ann. N. Y. Acad Sci.**, v. 967, p. 120-134, 2002.

ZIMMERMANN, T.; HUMMEL, L. Studies on the fatty acid synthesis in maternal and fetal rats. **Acta Biol. Med. Ger.**, v. 37, n. 2, p. 223-227, 1978.