



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto



Henrique Jorge Novaes Morgan

Participação de CREB/CRTC-2 na ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática induzida pela inervação noradrenérgica, durante o estresse térmico, em camundongos

Ribeirão Preto – SP

2021

Henrique Jorge Novaes Morgan

Participação de CREB/CRTC-2 na ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática induzida pela inervação noradrenérgica, durante o estresse térmico, em camundongos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Ribeirão Preto – SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Morgan, Henrique Jorge Novaes

Participação de CREB/CRTC-2 na ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática induzida pela inervação noradrenérgica, durante o estresse térmico, em camundongos. Ribeirão Preto : 2021.

73 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Navegantes, Luiz Carlos Carvalho.

1. AMPc 2. Ca²⁺. 3. FoxO. 4. Inervação simpática. 5. Noradrenalina

Nome: MORGAN, H. J. N.

Título: Participação de CREB/CRTC-2 na ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática induzida pela inervação noradrenérgica, durante o estresse térmico, em camundongos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: fisiologia.

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Para

Meus pais, Henrique e Claudia

Pelo exemplo de vida

Minhas irmãs, Isabela e Gabriela

Por serem minha fonte de inspiração e força

Meus avós, Vanda, Luis Henrique, Maria Helena e Sylvio

Pelo apoio, carinho e incentivo

Obrigado por sempre acreditarem em mim.

H.J.N.M.

Agradecimentos

Aos meus pais, Claudia e Henrique, por não medirem esforços para dar o melhor que a educação tinha a oferecer, a mim e as minhas irmãs. Hoje eu entendo o que sempre me disseram “educação não é gasto, é investimento”. Então, se cheguei até aqui foi por vocês e com vocês.

Ao Luiz Carlos Navegantes, que durante esse período me orientou da melhor forma possível, entendendo minhas limitações e em especial me incentivando e apoiando nas minhas ideias e ambições, sempre com uma palavra amiga. Muito obrigado por todos os seus ensinamentos, tanto em âmbito científico quanto pessoal, e pela amizade que construímos nesse período. A confiança depositada em mim e no meu trabalho foi fundamental e motivador. Espero continuar com essa nossa história por um longo tempo.

A Isis Kettelhut, o registro de minha gratidão e admiração. Sua bela história científica possibilitou a realização deste trabalho. Obrigado pelo exemplo de profissional e de pessoa, por todos os seus ensinamentos e pelas palavras e sorrisos que nos deixam sempre leves e nos conforta.

A todo Laboratório de Controle do Metabolismo, em especial Alexandre Zara, Aline Zanatta, Ana Assis, Dawit Gonçalves, Diego Leite, Elza Fillipin, Heitor Delfino, Karine Emanuelle, Letícia Andrade, Lilian Heck, Maria Antonieta Garófalo, Matheus Moro, Natalia Lautherbach, Natany Reis, Neusa Zanon, Rafael Rossi, Victor Galban e Willian Silveira. Obrigado pelos ensinamentos, conversas, risadas, broncas, sugestões, abraços e brincadeiras, mas principalmente pela amizade.

A Ana Domingos, com muito carinho e admiração, pela oportunidade que você me proporcionou e principalmente por acreditar em mim e no meu trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Obesidade e ao Departamento de Fisiologia da Universidade de Oxford, Inglaterra. Em especial ao Samuel Malone, Noelia Sánchez, Emma Haberman, Conan O'Brien, Berivan Sahin, Chelsea Larabee, Gitalee Sarker, Lola Dubrulle e Jasper Hunt. Obrigado por toda a ajuda, ensinamentos o por tornarem esse período da minha vida ainda mais especial.

Aos meus colegas e amigos dos Departamentos de Fisiologia e de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). Vocês tiveram uma contribuição enorme no desenvolvimento desse trabalho através de momentos que fizeram essa caminhada mais tranquila e suave.

A Cleíde Araujo e a Julianne Vargas do Hemocentro da FMRP pela valiosa ajuda e disposição na aquisição de dados no sistema de imagens *in vivo* (IVIS).

Ao Dr. Marc Montminy do Instituto de Salk, California, pelas contribuições intelectuais no desenvolvimento desse trabalho e pelos anticorpos e animais transgênicos gentilmente cedidos.

Ao laboratório do professor Vitor Faça do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP e a Ana Masson pelo anticorpo de STAT5 e ajuda no fracionamento celular.

Aos professores Fernando Ramalho e Leandra Ramalho do Departamento de Patologia da FMRP pela ajuda nas análises histológicas.

A laboratório dos professores José Antunes e Lucila Elias do Departamento de Fisiologia da FMRP e a Maria Valci pelas análises de corticosterona.

Ao laboratório do professor Tiago Cunha do Departamento de Farmacologia da FMRP e a Elidianne Aníbal pelo anticorpo de JNK.

A todo corpo docente, administrativo e técnico dos Departamentos de Fisiologia e de Bioquímica e Imunologia da FMRP por sempre estarem a disposição quando foi necessário. Em especial a Cláudia Vanzela, Elisa Aleixo e Fernando Rastello pelo apoio administrativo. A Evelin Cárnio pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho como minha supervisora.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; nº2019/05900-6, nº2019/26583-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; nº134636/2018-0) pela concessão da bolsa de mestrado e, juntamente com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A toda minha família, irmãs, tios, avós e primos, pelo incentivo, pela compreensão, pelo carinho e por sempre estarem ao meu lado, nesse e em todos os períodos da minha vida. Não tenho palavras para agradecer e dizer o quão importante são para mim.

Em especial, a Deus pela vida, e todos meus amigos espirituais que sempre estiveram comigo, me ajudando, me dando bons conselhos, colocando as pessoas certas e apontando a direção.

Este trabalho é resultado de um esforço conjunto de cada um de vocês que contribuíram de uma forma especial. Obrigado por acreditarem em mim e em meu trabalho. Os meus mais sinceros agradecimentos.

H.J.N.M.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê"

Arthur Schopenhauer

Resumo

MORGAN, Henrique Jorge Novaes. Participação de CREB/CRTC-2 na ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática induzida pela inervação noradrenérgica, durante o estresse térmico, em camundongos. 2021. 73 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2021.

É bem estabelecido que a proteína ligante ao elemento responsivo de AMPc (CREB) associada ao seu coativador transcricional do tipo 2 (CRTC-2) exerce um papel chave na indução do programa gênico da neoglicogênese hepática, em resposta ao glucagon. Entretanto, muito pouco se conhece sobre o papel do Sistema Nervoso Simpático (SNS) na modulação deste complexo transcricional e seus efeitos fisiológicos resultantes. O trabalho teve como objetivo investigar a participação de CREB/CRTC-2 na ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática induzida pela inervação simpática, durante o estresse térmico, em camundongos. Inicialmente, investigou-se a arquitetura da inervação noradrenérgica do fígado de camundongos (C57Bl6J) machos pela técnica de 3DISCO (Imagens 3D de órgãos clareados com solvente) constatou-se que os nervos simpáticos ficam restritos à vasculatura. Em paralelo, camundongos foram simpatectomizados (6-hidroxiopamina; 100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹; T0, T2 e T7 dia de vida pós-natal; i.p) ou tratados com salina. Após 8-10 semanas, os animais foram expostos ao frio (4°C) ou mantidos em temperatura ambiente, por 3 e 6 horas. O fígado foi extraído para a quantificação de proteínas por *Western blot* e análise gênica por RT-PCR. A atividade transcricional de CREB *in vivo* foi avaliada por meio de camundongo repórter CRE-luciferase. Os resultados foram expressos em média ± EPM e submetidos à análise estatística apropriada (p<0,05). A exposição ao frio aumentou a glicemia, o conteúdo hepático de noradrenalina e de PEPCCK, uma enzima chave da neoglicogênese, bem como a fosforilação e atividade transcricional *in vivo* de CREB e de defosforilação de Ser²⁷⁵ CRTC-2. Todos esses efeitos foram abolidos ou atenuados pela simpatectomia. Verificou-se também que a exposição ao frio estimulou as cascatas de sinalização do AMPc e do Ca²⁺ e que a simpatectomia só foi capaz de modular proteínas relacionadas à via do Ca²⁺. Embora FoxO, assim como CREB, esteja também ativo no fígado de animais expostos ao frio, este fator transcricional não é modulado pelo SNS. Em conjunto, os dados indicam que CREB/CRTC-2 participam da ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática induzida pela inervação simpática, durante o estresse térmico agudo.

Palavras-chave: AMPc. Ca²⁺. FoxO. Inervação simpática. Noradrenalina.

Abstract

MORGAN, Henrique Jorge Novaes. Involvement of CREB / CRTC-2 in the activation of the genic program of hepatic gluconeogenesis induced by noradrenergic fibers, under cold stress, in mice. 2021. 73 p. Dissertation (Master in Physiology) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, State of São Paulo, 2021.

It is well established that the cAMP responsive element-binding protein (CREB) associated with its coactivator type 2 (CRTC-2) it is the key of activation of gluconeogenesis program in glucagon response. However, very little is known about the role of the Sympathetic Nervous System (SNS) in the modulation of this transcriptional complex and its resulting physiological effects. The work aimed to investigate the participation of CREB/CRTC-2 in the activation of the gene program of hepatic gluconeogenesis induced by sympathetic innervation, during cold stress, in mice. Initially, the architecture of noradrenergic innervation of the liver of male mice (C57Bl6J) was investigated by the 3DISCO (3D imaging of solvent-cleared organs) technique and it was found that the sympathetic nerves are restricted to the vasculature. In parallel, mice were sympathectomized (6-hydroxydopamine; 100 mg.kg⁻¹.day⁻¹; T0, T2 and T7 day of postnatal life; i.p) or treated with saline. After 8-10 weeks, the animals were exposed to cold (4°C) or at room temperature, for 3 and 6 hours. The liver was extracted for protein quantification by *Western blot* and gene analysis by RT-PCR. The transcriptional activity of CREB *in vivo* was evaluated using mouse reporter CRE-luciferase. The results were expressed as mean ± SEM and submitted to appropriate statistical analysis (p<0.05). Cold exposure increased blood glucose, hepatic norepinephrine and PEPCCK content, a key enzyme in gluconeogenesis, as well as phosphorylation and transcriptional activity *in vivo* of CREB and dephosphorylation of Ser²⁷⁵ CRTC-2. All of these effects have been abolished or attenuated by sympathectomy. It was also found that exposure to cold stimulated the signaling cascades of cAMP and Ca²⁺ and that sympathectomy was only able to modulate proteins related to the Ca²⁺ pathway. Although FoxO is also active in the liver of animals exposed to cold, this transcriptional factor is not modulated by the SNS. Together, the data indicate that CREB/CRTC-2 participates in the activation of the gene program of hepatic gluconeogenesis induced by sympathetic innervation, during acute cold stress.

Keywords: cAMP. Ca²⁺. FoxO. Noradrenaline. Sympathetic innervation.

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática do balanço entre as vias metabólicas da neoglicogênese e da glicólise hepática	17
Figura 2. Representação esquemática dos principais fatores transcricionais envolvidos na regulação humoral da maquinaria da neoglicogênese hepática	21
Figura 3. Representação esquemática dos componentes do sistema nervoso simpático e da síntese de catecolaminas	23
Figura 4. Representação esquemática da hipótese da transdução de sinal ativada pela inervação noradrenérgica na mobilização do complexo CREB/CRTC-2 no fígado	26
Figura 5. Representação esquemática da técnica 3DISCO em fígados inteiros	31
Figura 6. Representação esquemática do delineamento experimental <i>in vivo</i>	32
Figura 7. Reconstrução 3D das fibras simpáticas em fígado de camundongos marcados com TH	39
Figura 8. Caracterização do modelo experimental de exposição ao frio por 3 e 6 horas em camundongos inervados e simpatectomizados por 6-OHDA	41
Figura 9. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, na fosforilação de Tyr ⁶⁹⁴ STAT5 em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados	43
Figura 10. Participação de CREB na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo frio (3 e 6 horas) em camundongos inervados e simpatectomizados	44
Figura 11. Participação do CRTC-2/3 na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo frio (3 e 6 horas) em camundongos inervados e simpatectomizados	45
Figura 12. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, em proteínas intermediárias da via de sinalização do AMPc, em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados	47
Figura 13. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, em proteínas intermediárias da via de sinalização do Ca ²⁺ em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados	48
Figura 14. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, na fosforilação de Thr ¹⁸³ Tyr ¹⁸⁵ JNK em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados	49
Figura 15. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, em proteínas intermediárias da via de sinalização AKT/FoxO1/3 em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados.....	50
Figura 16. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, na fosforilação de Thr ¹⁸⁰ Tyr ¹⁸² P38 e na acetilação de Lys ^{256/262/271} FoxO1 em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados	51

Figura 17. Mecanismo proposto de ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática pela inervação noradrenérgica, durante o estresse térmico em camundongos 63

Lista de tabelas

Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados para <i>Western blot</i> e suas concentrações	35
Tabela 2. Relação da sequência dos <i>primers</i> utilizados para RT-PCR	36
Tabela 3. Concentrações plasmáticas de hormônios em camundongos simpatectomizados e inervados expostos ao frio e/ou à temperatura ambiente (TA) por 3 e 6 horas	42

Lista de siglas

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrometro
3D	3 dimensões
3DISCO	Imagens 3D de órgãos clareados com solvente
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
A	Adenina
A.S.C.	Área sob a curva
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AKT	Proteína Quinase B
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato
ANOVA	Análise de variância
AR	Receptores adrenérgicos
ATF-2	Fator de ativação transcricional 2
bZip	<i>Basic leucine zipper</i>
C	Citosina
C/EBPα	Proteína de ligação potenciadora de CCAAT α
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulina quinase
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulina quinase de classe II
CBP	Proteína ligante de CREB
CRE	Elementos de resposta ao AMPc
CREB	Proteína Ligante ao Elemento Responsivo de AMPc
CRE-luc	Camundongo C57BL/6J-Tyr-c-2J/J albino transgênicos CRE-luciferase repórter
CRTC-1/2/3	Coativadores transcricionais de CREB do tipo 1, 2 e 3
DBE	Éter dibenzílico
DCM	Diclorometano
DEPC	Dietil-pirocarbonato
dL	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPA	L-di-hidroxi-felilalanina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM	Erro padrão da média
F16BF	Frutose-1,6-bifosfatase
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FoxO1/3	Forkhead Box Protein O1/3
Frio IN	Animais expostos ao frio inervados
Frio SPT	Animais expostos ao frio simpatectomizados
g	Gramas
G	Guanina
G6P	Glicose-6- <i>P</i>
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GH	Hormônio do crescimento
GLUT-2/4	Transportador de glicose do tipo 2 e 4
GPCR	Receptor associado à proteína G
GR	Receptor de glicocorticoide
G α i	Subunidade G α do tipo inibitória
G α q	Subunidade G α do tipo q
G α s	Subunidade G α estimulatória
HCL	Ácido clorídrico
HDAC	Histonas deacetilases
HE	Hematoxilina e eosina
HPLC	Cromatógrafo líquido de alta performance
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositol-1,2,4-trisfosfato
JNK	Quinase c-Jun n-terminal
kDa	Kilodalton
kg	Quilograma
Km	Constante de afinidade
LKB1	Quinase hepática B1
Lys	Lisina
M	Molar
mA	Miliampere
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MeOH	Metanol

mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
n	Quantidade de amostra/animais
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
n°	Número
Nr4a1	Membros da família de receptores nucleares órfãos do grupo A1
P	Fosfo-
p	Nível de significância
p/s	<i>Photons</i> por segundo
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Piruvato carboxilase
PEPCK	<i>P</i> -enolpiruvato carboxiquinase
PFA	Paraformaldeído
pg	Picograma
PGC1- α	Receptor de ativação proliferativa de peroxisoma gama, coativador 1 alfa
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PNMT	Feniletanolamina n-metil transferase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
ROX	Carboxi rodamina
Rpl32	Proteína ribossomal 32
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SIK-2	Quinase induzida por sal do tipo 2
SIRT1	Sirtuína 1
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático

STAT5	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 5
T	Timina
T0	Dia do nascimento
T2	Segundo dia após o nascimento
T7	Sétimo dia após o nascimento
TA IN	Animais na temperatura ambiente inervados
TA SPT	Animais na temperatura ambiente simpatectomizados
TH	Tirosina hidroxilase
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
U.A.	Unidades arbitrárias
USP	Universidade de São Paulo
<i>vs</i>	<i>Versus</i>
X	Vezes

Lista de símbolos

#	Representação estatística de diferença com o grupo TA SPT
%	Porcentagem
*	Representação estatística de diferença com o grupo TA IN
=	Igual
±	Mais ou menos
≈	Aproximadamente
≤	Menor ou igual
§	Representação estatística de diferença com o grupo Frio IN
μ	Micro
Ca ²⁺	Íon cálcio
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₂	Fosfato monopotássico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de Sódio
NaN ₃	Azida sódica
°C	Temperatura em graus Celsius
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma

Sumário

1. Introdução	14
2. Objetivos	28
3. Materiais e métodos	
3.1. Animais	30
3.2. Imagens 3D de órgãos clareados com solvente - 3DISCO	30
3.3. Simpatectomia química	31
3.4. Delineamento experimental	32
3.5. Determinação de parâmetros metabólicos e dosagens hormonais	33
3.5.1. Mensuração da glicemia	33
3.5.2. Dosagem de catecolaminas no fígado e plasma	33
3.5.3. Determinação de glucagon e insulina plasmática	33
3.5.4. Determinação de corticosterona plasmática	33
3.6. Conteúdo e estado de fosforilação proteica por <i>Western blot</i>	34
3.7. Expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real	35
3.8. Avaliação da atividade transcricional de CREB <i>in vivo</i>	36
3.9. Análise histológica	36
3.10. Análise estatística	37
4. Resultados	
4.1. Arquitetura da inervação noradrenérgica intra-hepática	39
4.2. Caracterização do modelo de estresse térmico e da simpatectomia química	40
4.3. Participação de CREB na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo frio	43
4.4. Participação de CRTC-2/3 na ativação da neoglicogênese hepática pelo frio	45
4.5. Participação das vias de sinalização do AMPc e Ca ²⁺ na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo simpático, durante o estresse térmico	46
4.6. Participação de FoxO na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo simpático, durante o estresse térmico	49
5. Discussão	53
6. Conclusões	65
Referências	66

Introdução

1. Introdução

Em meados de 1865, Claude Bernard (1813-1878) disse a célebre frase “*La fixité du milieu intérieur est la condition de la vie libre*” que introduziu a ideia do organismo se autorregular para manter constante seu próprio meio interno, dando assim início à fisiologia moderna. A manutenção dos níveis de glicose no sangue (glicemia) ou homeostase glicêmica é um dos ajustes fisiológicos mais importantes e complexos do organismo pois envolve diversas vias metabólicas e fatores regulatórios que juntos garantem o suprimento adequado deste nutriente para diferentes tecidos (BARCROFT, 1932; HADDAD-JUNIOR, 2012). Portanto, o estudo dos mecanismos moleculares da regulação da homeostase glicídica é de fundamental importância para a saúde e doenças humanas.

A homeostase glicêmica é mantida pelo balanço entre o fornecimento de glicose, advinda da alimentação e da produção hepática de glicose, e a captação e utilização desse substrato pelos diferentes tecidos que compõem o organismo. Esses processos são regulados por diversos fatores envolvendo os nutrientes, o sistema nervoso e o sistema endócrino, que por meio de interações diversas asseguram o fornecimento, armazenamento e uso adequado desse substrato energético (KETTELHUT; NAVEGANTES; MIGLIORINI, 2012). Alterações nesse equilíbrio dinâmico levam a diversas patologias de grande impacto social como a resistência à insulina, a obesidade e o diabetes mellitus (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Nesse contexto, o fígado assume grande importância por estar envolvido na captação de glicose, bem como ser o órgão central no fornecimento endógeno dessa hexose para o sangue e, na sua adequação frente às necessidades fisiológicas e situações de estresse (RUI, 2017).

O fígado é o maior órgão visceral do corpo humano. Está localizado abaixo do diafragma, com sua porção maior na região abdominal direita, e se estende até o abdômen esquerdo. Os hepatócitos são as principais células hepáticas e representam cerca de 80% do órgão. Morfologicamente, o fígado é composto por 4 lobos, sendo dois maiores (direito e esquerdo) separados pela fissura umbilical na face inferior e pelo ligamento falciforme na face ântero-superior, e dois lobos menores, o quadrado e caudado. A vascularização aferente (veia porta e artéria hepática) chega ao fígado na região do hilo, de onde também parte o ducto biliar hepático. Todo sangue que adentra o fígado é drenado até à veia cava inferior pela veia hepática (RUI, 2017; TRIVIÑO; ABIB, 2003). Apesar de haver diferenças morfológicas e funcionais hepáticas entre os seres vivos, no camundongo essas características são bastante semelhantes aos seres humanos (SÄNGER et al., 2015; TAG et al., 2015).

A capacidade do fígado em conseguir captar grandes quantidades de glicose se deve à presença do transportador de glicose do tipo 2 (GLUT-2), o qual não é dependente da ação da insulina e possui alta constante de afinidade (K_m) para essa hexose. Dentro do hepatócito, a glicose é fosforilada pela hexoquinase IV (glicoquinase), gerando a glicose-6-P (G6P) que por ser incapaz de ser transportada via GLUT, fica retida na célula. A glicoquinase é uma enzima chave da captação de glicose hepática por possuir alto K_m e não ser inibida por seu produto, assim, a formação de G6P reduz a concentração de glicose intracelular estimulando sua captação. Diferentemente do fígado, o tecido muscular esquelético e tecido adiposo branco possuem GLUT-4 (transportador de glicose do tipo 4) como transportador, sendo este dependente da ação da insulina, e um tipo de hexoquinase que, por ter um K_m menor do que a glicoquinase, é inibida por seu produto. Portanto, em uma situação de período pós prandial, por exemplo, onde há aumento da glicemia advinda da dieta, o fígado tem maior capacidade de captar esse monossacarídeo do que outros tecidos metabolicamente ativos e, assim, normalizar a glicemia (KETTELHUT; NAVAGANTES; MIGLIORINI, 2012; RUI, 2017).

No estado pós-prandial, a insulina é um hormônio chave no controle do metabolismo glicêmico hepático. Apesar de não interferir na captação de glicose hepática, ela estimula diretamente a atividade e expressão das enzimas chaves da oxidação de glicose bem como da síntese de glicogênio e lipídios. Por outro lado, em períodos de jejum, quando a glicemia e a secreção pancreática de insulina reduzem, o fígado assume o papel principal no controle da homeostase glicídica por meio da ativação da produção hepática de glicose, um processo que eleva a glicemia e compreende duas vias metabólicas: a glicogenólise e a neoglicogênese (KETTELHUT; NAVAGANTES; MIGLIORINI, 2012; RUI, 2017).

C. Bernard foi o primeiro a demonstrar que o fígado era capaz de produzir glicose através do famoso experimento do “fígado lavado”. Após perceber que durante o jejum a glicemia era mantida constante, Bernard tornou-se descrente da ideia da época de que o nível de glicose no sangue era devido apenas à alimentação e assim realizou uma série de experimentos na tentativa de identificar a origem interna desse monossacarídeo no organismo. Fazendo uma “lavagem” em diversos órgãos para retirar toda a glicose do meio e mantendo-os em condições adequadas, averiguava, após um tempo, a concentração dessa hexose na solução. Nessa série de experimentos constatou que a solução do “fígado lavado” apresentava altas concentrações de glicose quando comparada a de outros órgãos e concluiu que a hexose era produzida pelo tecido hepático (HADDAD-JUNIOR, 2012). Hoje, sabemos que a glicose que C. Bernard identificou no meio era provavelmente proveniente da glicogenólise hepática.

A glicogenólise é a primeira via metabólica a ser recrutada pelo fígado com vistas à mobilização de glicose de forma rápida. Isso ocorre através da degradação do glicogênio sintetizado e armazenado no fígado no período pós-prandial pela ação da insulina. Diferentemente da insulina, sabe-se que hormônios como glucagon e a adrenalina estimulam diretamente a degradação desse polissacarídeo (RUI, 2017).

A neoglicogênese ou gliconeogênese é uma via metabólica de produção de glicose a partir de substratos não glicídicos de 3 ou 4 carbonos, como lactato, glicerol e aminoácidos, sendo um mecanismo mais tardio no controle da glicemia, aumentando sua contribuição à medida que ocorre redução do estoque de glicogênio (NELSON; COX, 2014; RUI, 2017). Embora ocorra principalmente no fígado, o córtex renal também é capaz de realizá-la assim como o epitélio interno do intestino delgado (DE VADDER et al., 2016; GERICH et al., 2001). É uma via metabólica que consiste na reversão da via glicolítica e compartilha 7 das 10 reações enzimáticas da oxidação da glicose. Isso ocorre devido à presença de 3 enzimas hepáticas que conseguem reverter as reações essencialmente irreversíveis e endergônicas da glicólise. Entre estas, destaca-se a *P*-enolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) que converte oxaloacetato em *P*-enolpiruvato, a frutose-1,6-bifosfatase (F16BF) que converte frutose-1,6-bi-*P* em frutose-6-*P*, e a Glicose-6-fosfatase (G6Pase), enzima que catalisa a defosforilação da glicose-6-*P* (NELSON; COX, 2014) (figura1).

O balanço entre o fluxo das vias neoglicogênica e glicolítica é regulado de diversas formas, sendo o mais estudado e descrito na literatura o controle humoral exercido pela insulina e glucagon. A insulina estimula o fluxo de carbonos para a via glicolítica através do controle das enzimas envolvidas nesse processo e inibe a neoglicogênese por meio da redução de fornecimento de *P*-enolpiruvato que ocorre pelo estímulo da produção de acetil-CoA (acetil-coenzima A) a partir do piruvato e da inibição das enzimas PEPCK e piruvato carboxilase (PC), enzima esta que catalisa a formação de oxaloacetato a partir do piruvato. De forma oposta, o glucagon direciona o fluxo de carbonos para a síntese de glicose através do estímulo das enzimas G6Pase, F16BF, PEPCK e PC e com isso aumenta a geração de *P*-enolpiruvato. Além disso, reduz a oxidação dessa hexose pela inibição das enzimas envolvidas na via glicolítica (KETTELHUT; NAVEGANTES; MIGLIORINI, 2012; NELSON; COX, 2014) (figura1).

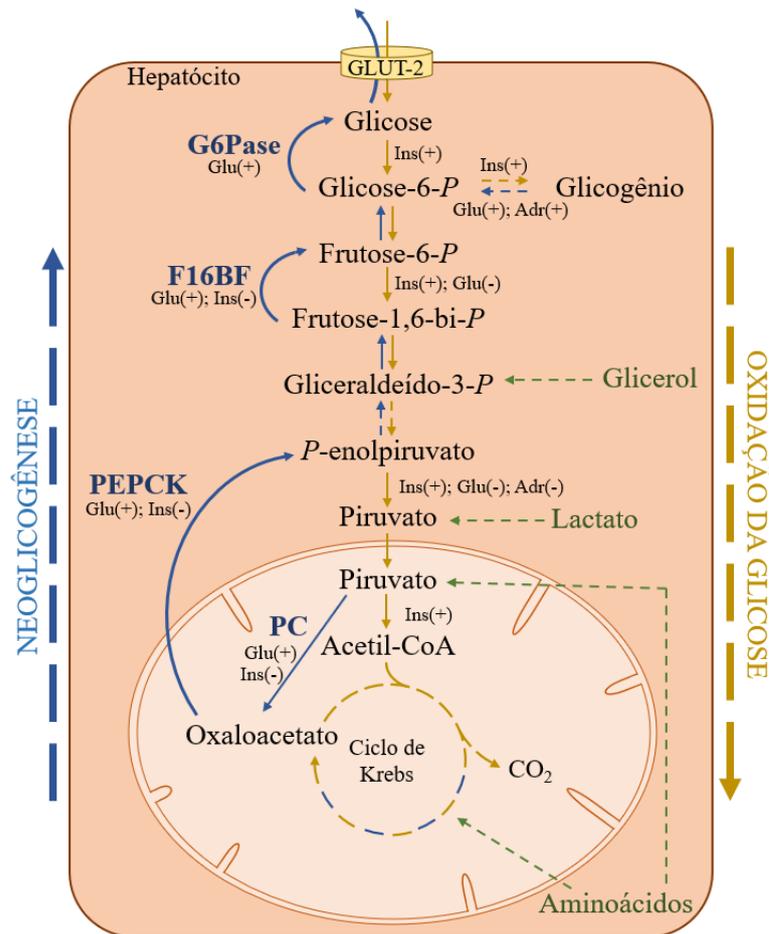


Figura 1. **Representação esquemática do balanço entre as vias metabólicas da neoglicogênese e da glicólise hepática.** Descrição da figura no texto. Seta tracejada indica que há outras reações no caminho; seta contínua, reação direta. (+) estimulação; (-) inibição; (Ins) insulina; (Glu) glucagon; (Adr) adrenalina. Fonte: autor.

A velocidade da reação da neoglicogênese é determinada pela disponibilidade de substratos bem como pela expressão e atividade de suas enzimas-chaves. Os substratos são providos por reservas do próprio fígado ou de tecidos extra-hepáticos que chegam pela circulação sanguínea. O glicerol oriundo da hidrólise de triacilglicerídeos adentra na via por meio de uma série de reações que resultam na formação do gliceraldeído-3-*P*, não necessitando da PEPCK para a geração de nova glicose. Já o lactato é convertido a piruvato pela enzima lactato desidrogenase e daí a oxaloacetato pela PC. Se o lactato for catabolizado a acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase, seu destino é ser completamente oxidado a CO₂ pelo ciclo de Krebs. O mesmo ocorre com a beta-oxidação dos ácidos-graxos, que são convertidos a acetil-CoA para serem introduzidos no ciclo do ácido cítrico e assim não são utilizados como substrato para a geração de glicose “de novo”. Os aminoácidos são providos pela proteólise, sendo sua fonte principal o músculo estriado esquelético. Pela reação da desaminação, os

aminoácidos formam α -cetoácidos, os quais são convertidos a intermediários do ciclo de Krebs que, por meio da conversão a oxaloacetado, podem ascender a via de geração de nova glicose (RUI, 2017). Entretanto, somente os aminoácidos chamados de glicogênicos, ou seja, aqueles que podem ser catabolizados a intermediários do ciclo de Krebs ou a piruvato, podem participar da neoglicogênese. A alanina e glutamina são os principais aminoácidos glicogênicos nos mamíferos e seus esqueletos de carbono geram piruvato e α -cetogluturato, respectivamente (NELSON; COX, 2014).

As enzimas-chaves da neoglicogênese (G6Pase, F16BF e PEPCK) podem ter sua atividade modulada por diversos tipos de modificações pós-traducionais e alostéricas, entretanto pouco se conhece sobre essas regulações. A literatura relata que a atividade dessas enzimas está mais ligada à expressão de seus genes codificadores. Os principais fatores transcricionais descritos e caracterizados na literatura que regulam a velocidade de transcrição dos genes da neoglicogênese são o CREB (proteína ligante ao elemento responsivo de AMPc) e FoxO1 (Forkhead Box Protein O1), embora inúmeros outros já tenham sido descritos como o PGC1- α (receptor de ativação proliferativa de peroxisoma gama, coativador 1 α) e o C/EBP α (proteína de ligação potenciadora de CCAAT α) (RUI, 2017).

Erion et al. (2009) demonstraram que o *knockdown* de CREB no fígado de roedores foi capaz de reduzir a produção hepática de glicose, em modelo de diabetes tipo 2. Matsumoto et al. (2007) relataram que a deleção hepática de FoxO1 em camundongos jejuados reduziu a produção hepática de glicose, levando à hipoglicemia. Ambos fatores, CREB e FoxO1, também são responsáveis por estimular a transcrição de *Ppargc1a*, o gene codificador do PGC1- α . O PGC1- α é descrito como importante cofator transcricional da maquinaria da neoglicogênese, principalmente em situações onde a produção de nova glicose é sustentada por longos períodos (HERZIG et al., 2001; LIU et al., 2008).

É bem descrito o papel do componente humoral e, mais particularmente, do glucagon, hormônio do crescimento (GH) e dos glicocorticoides na ativação da maquinaria gênica da neoglicogênese (RUI, 2017). Em contrapartida, a insulina é um potente inibidor dessa maquinaria. Michael et al. (2000) demonstraram que a deleção específica de receptores de insulina no fígado leva ao aumento da neoglicogênese e conseqüente aumento da glicemia.

O glucagon estimula o programa neoglicogênico, principalmente, por meio da ativação de sua via canônica que envolve a geração intracelular de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc, por sua vez, se liga nas regiões reguladoras da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) liberando suas subunidades catalíticas, que vão para o núcleo fosforilar e ativar

CREB no resíduo de *Ser*¹³³, que é o principal fator transcricional que desencadeia as respostas fisiológicas do glucagon (GOLDSTEIN; HAGER, 2018) (figura 2).

Quando fosforilado, *Ser*¹³³ CREB forma um complexo transcricional com as histonas acetiltransferases, p300 e CBP (proteína ligante de CREB), que passam então a acetilar as histonas e promover o afrouxamento da interação entre a dupla fita de DNA (ácido desoxirribonucleico), efeito este que facilita a interação de CREB com suas regiões promotoras gênicas conhecidas como CREs (elemento de resposta ao AMPc). Estas regiões contêm a sequência palindrômica de nucleotídeos (TGACGTCA) ou CGTCA / TGACG, que uma vez ligadas a CREB dão início à transcrição de *G6pc* e *Pck1*, respectivos genes codificadores da *G6Pase* e *PEPCK* (ALTAREJOS; MONTMINY, 2011; MONTMINY; BILEZIKJIAN, 1987). Além do AMPc, há evidências de que, em situações de elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} , CREB seja fosforilado em *Ser*¹³³ pela Ca^{2+} /Calmodulina quinase (CaMK), o mesmo resíduo modulado por PKA (MAYR; MONTMINY, 2001; SCREATON et al., 2004).

Estudos mais recentes mostram que CREB necessita de coativadores para estabilizar sua interação com as histonas acetiltransferases e, dessa forma, agir de forma seletiva e eficiente na expressão de seus genes alvo. A família dos coativadores transcricionais de CREB (CRTC) é composta por 3 membros (CRTC-1, CRTC-2, CRTC-3) que variam sua expressão de acordo com os diferentes tecidos. Sabe-se que o CRTC-2 é o mais expresso em hepatócitos. Apesar de CRTC-3 apresentar sua importância no fígado ele está mais presente no tecido adiposo branco e marrom. Por outro lado, a importância de CRTC-1 ocorre principalmente no sistema nervoso central (SNC) (ALTAREJOS; MONTMINY, 2011; KOO et al., 2005). A participação de CRTC é chave na transcrição gênica diferenciada frente a diferentes sinais extracelulares que recrutam CREB (RAVNSKJAER et al., 2007).

Ao contrário de CREB, os CRTCs são inativados por fosforilação. Em período pós-prandial, o CRTC-2 é fosforilado em *Ser*¹⁷¹ pela SIK2 (quinase induzida por sal do tipo 2), evento que favorece a interação desse coativador com as proteínas 14-3-3, o que o apreende no citosol e reduz sua associação com CREB. A ativação de SIK2 é um dos mecanismos pelos quais a insulina promove a inibição da neoglicogênese hepática. Por outro lado, durante o jejum, pela ação do glucagon, o CRTC-2 é defosforilado pela inibição de SIK2 promovida pela ativação de PKA e, desta forma, é recrutado para o núcleo, onde se acopla a CREB facilitando a interação com histonas acetiltransferases e promovendo ativação de genes alvos da neoglicogênese (PATEL et al., 2014). Além da via do AMPc/PKA, sabe-se que aumentos citosólicos de Ca^{2+} podem levar à ativação de CRTC-2 por defosforilação do resíduo de *Ser*²⁷⁵

mediada pela calcineurina fosfatase (GOLDSTEIN; HAGER, 2018; MAYR; MONTMINY, 2001; SCREATON et al., 2004; WANG et al., 2012).

Assim como CREB, a família de FoxO, em especial FoxO1 e FoxO3, é capaz de levar à ativação da neoglicogênese hepática (MIHAYLOVA et al., 2011). A inibição da atividade transcricional desses fatores constitui o principal alvo da ação inibitória da insulina na produção de glicose “de novo” no fígado (O-SULLIVAN et al., 2015; ZHANG et al., 2012). A insulina consegue inibir FoxO via ativação da Proteína Quinase B (AKT ou PKB), uma enzima clássica que regula negativamente a atividade de FoxO1 por meio de sua fosforilação em resíduos de *Ser*²⁵⁶, *Ser*³¹⁹ e *Thr*²⁴ e FoxO3, em *Ser*²⁵³ e *Thr*³². Essas fosforilações levam à exportação desse fator transcricional do núcleo para o citoplasma e sua consequente inativação (MIHAYLOVA et al., 2011; O-SULLIVAN et al., 2015). O-Sullivan et al. (2015) demonstraram que, na ausência de insulina FoxO1 aumenta a produção hepática de glicose e na presença desse hormônio, a AKT fosforila e inativa esse fator transcricional, suprimindo a neoglicogênese (figura 2).

Ozcan et al. (2012) demonstraram que por meio da sinalização de AMPc desencadeada pelo glucagon, PKA consegue fosforilar o receptor de IP3 (inositol-1,2,4-trisfosfato) do retículo endoplasmático, o que leva à liberação de Ca^{2+} e ativação da CaMK de classe II (CaMKII). Essa quinase dependente de Ca^{2+} mobiliza a P38 MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e, conseqüentemente, ativa FoxO1 por fosforilação em resíduo estimulatório ainda não identificado promovendo assim a transcrição de genes da neoglicogênese. Mihaylova et al. (2011) demonstraram que o glucagon também aumenta a atividade de FoxOs por meio do recrutamento das HDAC (histonas deacetilases) de classe IIa para o núcleo. Essas enzimas deacetilam FoxOs no núcleo e aumentam sua atividade. O glucagon consegue também importar as HDACs para o núcleo via PKA, a qual inibe as proteínas quinases responsáveis por fosforilar e manter as HDACs no citoplasma (figura 2).

O CRTC-2 pode também ser modulado por mecanismos de acetilação. Liu et al. (2008) demonstraram que, durante a ativação da neoglicogênese induzida pelo jejum curto (6 h), CRTC-2 é acetilado pela p300 e CBP, o que favorece sua associação com CREB e consequente transcrição gênica. Durante o jejum prolongado (12 h), a SIRT1 (sirtuína 1) deacetila CRTC-2 e promove sua degradação via ubiquitinação, enquanto deacetila FoxO1 e favorece seu controle na maquinaria gênica da neoglicogênese.

A ativação da neoglicogênese pelos glicocorticoides envolve a participação de FoxO1. O receptor de glicocorticoide (GR), quando ativado pelo hormônio, inibe AKT e como resultado reduz a sinalização de insulina e favorece a defosforilação de FoxO, o qual é

importado o núcleo para transcrever genes da neoglicogênese (KURO et al., 2015). O GR pode também atuar como fator transcricional e, assim, aumentar diretamente a transcrição dos genes da PEPCK e G6Pase (KINOTE et al., 2012; WINKLER et al., 2012). A atividade do GR pode ser aumentada pelo CRTC-2 que, assim como CREB, se comporta como um coativador no sentido de facilitar a associação do GR com a região promotora de G6pc e Pck1 (HILL et al., 2016). A deleção hepática específica de GR inibe a expressão de genes neoglicogênicos e reduz a glicemia em roedores jejuados (OYADOMARI et al., 2008). O GH modula a neoglicogênese via ativação do STAT5 (Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 5), o qual sabidamente possui um domínio de ligação no gene da PEPCK (KIM et al., 2012) (figura 2).

O controle hormonal na neoglicogênese varia de acordo com o estado nutricional e o estado fisiológico do animal. Enquanto a insulina e o glucagon são hormônios que respondem ao estado alimentar e são regulados principalmente pelos níveis de glicose no sangue, a corticosterona e o GH estão envolvidos mais em respostas ao estresse (RUI, 2017).

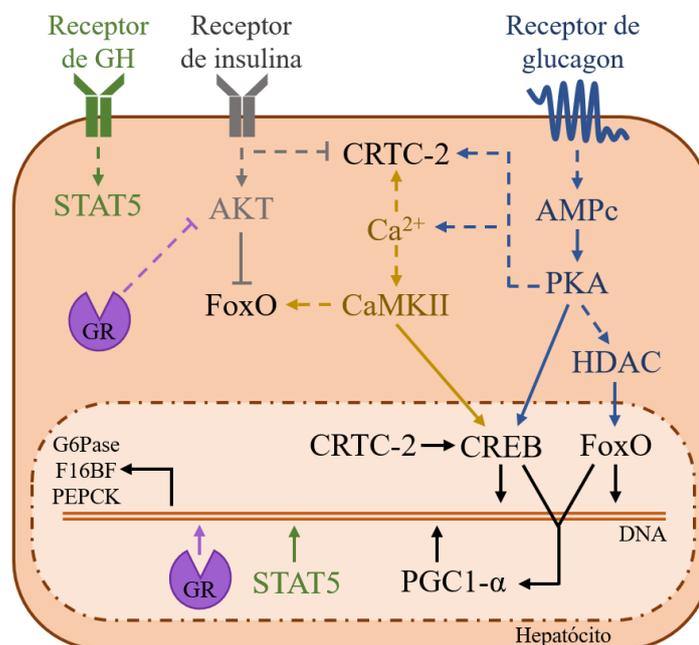


Figura 2. **Representação esquemática dos principais fatores transcricionais envolvidos na regulação hormonal da maquinaria da neoglicogênese hepática.** Descrição da figura no texto. Seta tracejada indica que há outras reações no caminho; seta contínua, reação direta. Fonte: autor.

A neoglicogênese é um processo altamente conservado evolutivamente, estando presente em todos os filós. Sua importância funcional garante a disponibilidade de glicose para todo o organismo e, em especial para o SNC, que depende quase que completamente dessa hexose para seu funcionamento (NELSON; COX, 2014). Portanto, é compreensível a existência

de um controle neural direto sobre a produção de glicose hepática no sentido de evitar a falta desse substrato energético, principalmente em situações de grandes demandas energéticas.

Diferentemente do controle humoral, muito pouco ainda se conhece sobre o papel do SNC no controle do metabolismo intermediário. O SNC, por meio de seus neurônios quimiosensíveis localizados em diferentes áreas hipotalâmicas (ventromedial, arqueado, supraquiasmático e paraventricular) e do tronco cerebral (substância *nigra*, área preoptica e núcleo do trato solitário) (KETTELHUT; NAVAGANTES; MIGLIORINI, 2012; OOMURA; YOSHIMATSU, 1984), é capaz de detectar os níveis glicêmicos e gerar uma resposta metabólica apropriada via modulação do sistema autonômico simpático e parassimpático em diferentes tecidos, inclusive no fígado.

A primeira evidência do controle do SNC na glicemia data de 1849 quando se demonstrou que a estimulação do 4º ventrículo cerebral em cães aumentou a glicosúria (BERNARD, 1849). Trabalhos publicados entre as décadas de 70-90 demonstraram que o SNC por intermédio do sistema nervoso simpático (SNS), via inervação direta ou pela secreção de adrenalina, era capaz de estimular a produção hepática de glicose, enquanto o componente parassimpático teria o papel antagonista (JÄRHULT et al., 1980; LAUTT; WONG, 1978; MIGLIORINI et al., 1989). Apesar de ainda não haver evidências consistentes de que fibras vagais interfiram diretamente na neoglicogênese, sabe-se, por exemplo, que elas estimulam a secreção de insulina no pâncreas e, indiretamente, levam à inibição da produção hepática de glicose (LAUTT; WONG, 1978; MATSUHISA et al., 2000).

Os corpos celulares dos neurônios simpáticos estão localizados na medula espinal e se projetam para a cadeia ganglionar paravertebral ou para medula adrenal por meio das raízes ventrais que partem do primeiro segmento torácico até o segundo segmento lombar. Dos gânglios da cadeia paravertebral partem terminações nervosas periféricas que vão até diferentes órgãos e tecidos alvos e liberam, principalmente, noradrenalina nos terminais nervosos. Isto gera uma resposta tecido-específica que é capaz de regular, por exemplo, a secreção de hormônios como o glucagon e a insulina, ou modular o metabolismo do tecido. Por sua vez, a medula adrenal é composta de células cromafins, as quais são produtoras e secretoras de adrenalina. Quando estimuladas, estas células liberam adrenalina na corrente sanguínea e geram uma resposta endócrina que amplifica a ação local da inervação noradrenérgica (GILBEY; MICHAEL SPYER, 1993). Apesar das catecolaminas serem sintetizadas pela mesma via, ou seja, a partir da conversão de tirosina em DOPA (L-di-hidroxi-fenilalanina) pela ação da tirosina hidroxilase (TH), a conversão de noradrenalina para adrenalina é restrita às células cromafins

por conta da presença da PNMT (feniletanolamina n-metil transferase) que não há nos terminais noradrenérgicos (ZAIA, 2009) (figura 3).

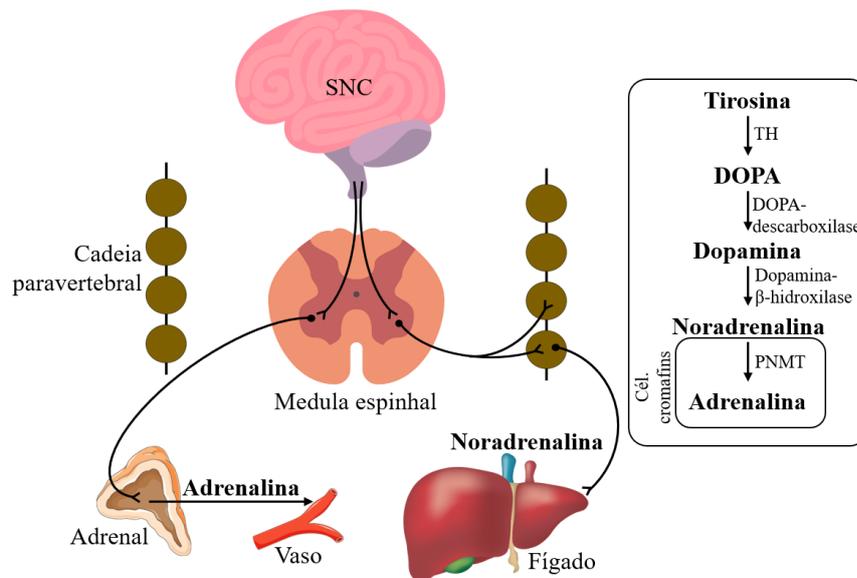


Figura 3. **Representação esquemática dos componentes do sistema nervoso simpático e da síntese de catecolaminas.** Descrição da figura no texto. Fonte: autor (adaptado de NAVEGANTES, L. C. C., 1998).

Há diferentes evidências na literatura acerca do papel das catecolaminas, e principalmente da adrenalina, na regulação da produção hepática de glicose. Sacca et al. (1983) demonstraram que a infusão de adrenalina em humanos aumentou a glicemia em 50-60%, sendo este efeito decorrente de uma ativação inicial da glicogenólise e, posteriormente, da neoglicogênese. Morgan et al. (1982) observaram que a perfusão de adrenalina em fígado de ratos causava aumento no fluxo de Ca^{2+} citoplasmático que se correlacionava com o aumento da glicose circulante e do conteúdo intracelular de IP3. Resultados semelhantes foram observados após a estimulação farmacológica dos receptores adrenérgicos (AR) hepáticos. Em outros estudos, Torres e Nowson, (2007) demonstraram que a ativação do SNS em resposta ao estresse emocional alterou a glicemia e predisps ao desenvolvimento de resistência à insulina, obesidade e diabetes.

Estudos pioneiros realizados em nosso laboratório pelo Dr. Renato Migliorini demonstraram que a injeção de agentes colinérgicos no hipotálamo de ratos aumentou rapidamente a glicemia, o lactato plasmático e a produção de glicose hepática. Esses efeitos foram abolidos pela adrenodemedulação, o que indica que o SNS é capaz de modular a neoglicogênese hepática, em ratos, por meio da secreção medular de adrenalina (BRITO et al., 1993; MIGLIORINI et al., 1989). Entretanto, o papel da inervação noradrenérgica na regulação

do metabolismo hepático é pouco conhecido e ainda não se sabe sobre suas contribuições na regulação da neoglicogênese.

As fibras simpáticas que inervam o fígado são derivadas do nervo esplâncnico que emerge do gânglio celíaco e adentram ao fígado pelo sistema vascular (MIZUNO; UENO, 2017). Embora a distribuição intra-hepática dessas fibras no fígado ainda não seja bem descrita, acredita-se que sua arquitetura varia entre as espécies (JENSEN; ALPINI; GLASER, 2013). Em humanos, os trabalhos sugerem que os feixes simpáticos adentram o parênquima hepático, enquanto nos roedores estão restritos à vasculatura (AKIYOSHI; GONDA; TERADA, 1998; CHIDA et al., 2005).

Shimazu e Fukuda (1965) foram os primeiros a demonstrar que a estimulação do nervo esplâncnico em coelhos causava redução do conteúdo de glicogênio hepático, muito provavelmente resultante da ativação da enzima glicogênio fosforilase, responsável pela hidrólise do glicogênio. Os mesmos efeitos foram observados em coelhos adrenalectomizados e pancreatomizados, sugerindo que essa resposta não era mediada pelos hormônios pancreáticos ou pela porção adrenal do simpático. Por outro lado, Järhult et al. (1980) observaram que a estimulação das fibras simpáticas hepáticas em gatos adrenalectomizados causava um sutil aumento na glicemia, e que quando estimulavam de forma conjunta as fibras simpáticas hepáticas e pancreáticas gerava um pronunciado aumento dos níveis glicêmicos, sugerindo que o papel da inervação no controle hepático da glicemia dependia do controle da secreção dos hormônios pancreáticos. Em outro estudo da década de 80, verificou-se que a administração de noradrenalina, em cães, aumentava a glicemia devido à estimulação da glicogenólise, efeito este que era abolido pela administração de antagonistas dos AR hepáticos (GARCEAU; YAMAGUCHI; GOYER, 1985). Esse conjunto de trabalhos demonstra a importância da ação glicogenolítica da noradrenalina, entretanto o papel desse neurotransmissor na regulação da neoglicogênese e os mecanismos moleculares envolvidos não são ainda totalmente conhecidos.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou, recentemente, que a ativação da inervação noradrenérgica pelo estresse térmico (4°C) em camundongos levou ao aumento da glicemia e da expressão dos genes e atividade de enzimas-chaves da neoglicogênese, sendo esses efeitos abolidos pela simpatectomia química por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Resultados semelhantes foram encontrados em ratos desnervados com fenol submetidos ao mesmo modelo de estresse térmico (DELFINO, 2018). O modelo de exposição ao frio (4°C) se destaca por ativar os nervos simpáticos em diferentes tecidos, inclusive no fígado, de forma independente da secreção de catecolaminas pela glândula adrenal (LANDSBERG; YOUNG, 1984), possibilitando assim o estudo da regulação seletiva da inervação noradrenérgica no

metabolismo de um determinado tecido. Estes resultados demonstram, pela primeira vez, que a inervação simpática noradrenérgica do fígado tem um papel fisiológico relevante na manutenção glicêmica, durante o estresse térmico, por meio da ativação de enzimas e do programa gênico da neoglicogênese. Entretanto os mecanismos moleculares envolvidos nesta resposta ainda não são conhecidos.

Os AR hepáticos são do sub-tipo $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 2$, sendo todos membros da família do GPCRs (receptores associados à proteína G) acoplados à proteína G heterotrimérica, a qual é composta pelas subunidades $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$. Os AR mais caracterizados e estudados na resposta hepática frente ao componente simpático são o $\alpha 1$ e $\beta 2$. Estudo em ratos demonstram que, após o nascimento, a densidade dos AR $\alpha 2$ é drasticamente reduzida, enquanto que a dos $\alpha 1$ e $\beta 2$ apresentam um aumento significativo. Já na vida adulta, há evidências de que os AR α estão em maior número em relação aos β no fígado de animais (MCMILLIAN; SCHANBERG; KUHN, 1983). As catecolaminas conseguem se associar a ambos receptores, porém é bem estabelecido que a noradrenalina possui maior afinidade aos AR do tipo α (ZAIA, 2009).

Os AR $\beta 2$ e $\alpha 1$ apresentam subunidades $G\alpha$ estimulatória ($G_{\alpha s}$) e $G\alpha$ do tipo q ($G_{\alpha q}$), respectivamente (EXTON, 1985; SCHMELCK; HANOUNE, 1980). A subunidade $G_{\alpha s}$ quando liberada da subunidade $G\beta\gamma$ ativa a enzima adenilato ciclase, o que leva ao aumento da concentração citosólica de AMPc e consequente ativação da PKA. Por outro lado, a ativação da subunidade $G_{\alpha q}$ estimula a enzima Fosfolipase C que, por sua vez, leva à liberação de Ca^{2+} no citosol, resultando assim na ativação da CaMK e da proteína quinase dependente de Ca^{2+} (PKC) (GOLDSTEIN; HAGER, 2018).

Por muito tempo se acreditou que as ações do AR $\alpha 2$ hepático, que sabidamente está associado à subunidade $G\alpha$ do tipo inibitória ($G_{\alpha i}$) e que inibe a formação de AMPc, estavam restritas à regulação do volume sanguíneo do fígado (EXTON, 1985; SEGSTRO; GREENWAY, 1986). No entanto, recentemente, Rossi et al. (2018) demonstraram em murinos e em linhagens humanas de hepatócitos que este AR tem um importante papel no estímulo da neoglicogênese hepática. Embora o mediador que desencadeia esta resposta ainda não esteja bem estabelecido, acredita-se que seja independente de AMPc e Ca^{2+} e que provavelmente envolva a fosforilação e ativação da JNK (quinase c-Jun n-terminal) por meio da produção de espécies reativas de oxigênio, levando ao aumento da expressão da maquinaria neoglicogênica.

Estudos clássicos do papel do componente simpático no metabolismo glicídico hepático demonstraram o envolvimento dos AR $\alpha 1$ e $\beta 2$ na indução da produção hepática de glicose. Taylor, Reinhart e Bygrave (1983), demonstraram que a perfusão com fenilefrina, agonista seletivo $\alpha 1$, em fígado de ratos, causava influxo de Ca^{2+} e aumento do consumo de oxigênio e

dos substratos neoglicogênicos. Essas respostas foram abolidas pela inibição de AR α sugerindo que a mobilização intracelular de Ca^{2+} por este AR participe da resposta da neoglicogênese. Em estudos realizados em cães jejuados, onde a concentração plasmática de insulina e glucagon foi mantida constante pela técnica de *clamp*, verificou-se que antagonistas α e $\alpha 1$ impediram a ativação da neoglicogênese, após a administração de noradrenalina. O mesmo ocorreu com a administração de adrenalina na presença de antagonistas β e $\beta 2$. Os autores concluíram que receptores $\alpha 1$ e $\beta 2$ são fundamentais a para indução da neoglicogênese pela noradrenalina e adrenalina, respectivamente (CHU et al., 2000).

Embora muito se conheça sobre os efeitos metabólicos citosólicos desencadeados por sinais extracelulares que agem no fígado por meio de mecanismos de modulação covalente dependentes do AMPc e/ou do Ca^{2+} , muito pouco ainda se conhece sobre as ações gênicas mediadas por estes segundos mensageiros em resposta, principalmente, a fatores neurais como as catecolaminas. Considerando o estudo anterior de Delfino (2018) que demonstrou que a simpatectomia de camundongos foi capaz de abolir e/ou atenuar o aumento da expressão de genes alvos de CREB induzida pelo frio e que ambos os ARs $\alpha 1$ e $\beta 2$ estão associados a vias de sinalizações capazes de ativar CREB e CRTC-2 no fígado, a hipótese a ser testada nesse projeto é que a noradrenalina liberada pela inervação simpática hepática, em resposta ao estresse térmico recrute o complexo CREB/CRTC-2 e ative o programa gênico da neoglicogênese por meio da ativação de duas vias de sinalização: $\beta 2$ /AMPc/PKA e $\alpha 1$ / Ca^{2+} /CaMKII (figura 4).

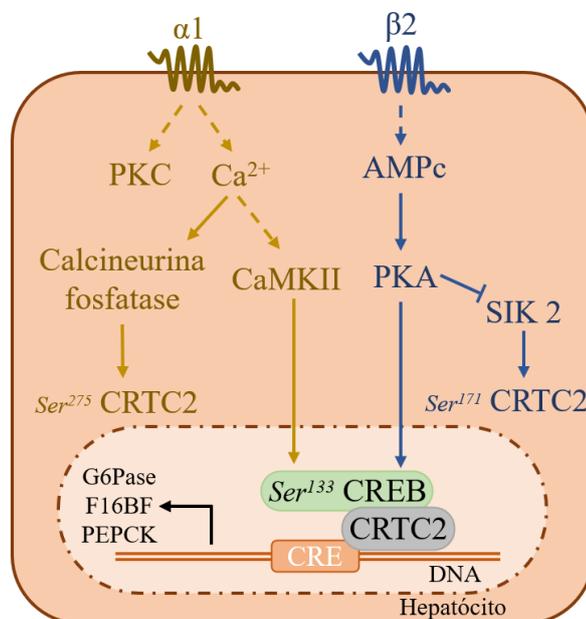


Figura 4. **Representação esquemática da hipótese da transdução de sinal ativada pela inervação noradrenérgica na mobilização do complexo CREB/CRTC-2 no fígado.** Descrição da figura no texto. Seta tracejada indica relação indireta; seta contínua, relação direta. Fonte: autor.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar a participação de CREB/CRTC-2 na ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática induzida pela inervação noradrenérgica em camundongos, durante o estresse térmico.

2.2. Objetivos específicos

Utilizando modelo de camundongos simpatectomizados expostos a baixas temperaturas (4°C), o presente trabalho teve como objetivo:

- a) realizar a reconstrução em 3D da arquitetura da inervação simpática intra-hepática de camundongos;
- b) caracterizar o modelo experimental de exposição ao frio por 3 e 6 horas em camundongos inervados e simpatectomizados por 6-OHDA;
- c) avaliar se CREB e CRTC-2 estão envolvidos na ativação hepática da neoglicogênese induzida pela noradrenalina;
- d) investigar a participação das vias de sinalização do AMPc e Ca^{2+} na ativação da neoglicogênese e na mobilização de CREB/CRTC-2;
- e) averiguar se FoxO poderia estar sendo modulado pela ativação noradrenérgica do fígado em resposta ao frio.

Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos e fêmeas entre 8-12 semanas de idade (≈ 25 g) das linhagens C57/Bl6J, proveniente do Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto, e C57BL/6J-Tyr-c-2J/J albina transgênicos CRE-luciferase repórter (CRE-luc) proveniente do Biotério de Camundongos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)-USP.

Os animais foram mantidos no Biotério de Camundongos da FMRP-USP dispostos em racks ventiladas ($n=3-5$), com temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($\approx 55\%$) controlada, ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), livre acesso à água e ração balanceada (Nuvilab CR1 – Nuvital).

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, seguindo as normas éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal-CONCEA, e aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP sob o protocolo nº183/2015.

3.2. Imagens 3D de órgãos clareados com solvente - 3DISCO

A técnica do 3DISCO foi utilizada para a reconstrução em 3D da arquitetura da inervação simpática intra-hepática de camundongos normais. Para isso, camundongos (C57/Bl6J) machos alimentados foram eutanasiados e perfundidos com PBS (tampão fosfato-salino; 0,14 M NaCl + 2,7 mM KCl + 10 mM Na_2HPO_4 + 1,8 mM KH_2PO_2) e posteriormente com PFA (paraformaldeído) 4%. O fígado foi cuidadosamente retirado por completo, limpo e fixado em PFA 4% por 24 horas sob refrigeração (4°C). O tecido foi lavado 3 vezes com PBS por 30 minutos cada sob rotação, posteriormente desidratado com lavagens crescentes de metanol (MeOH 20, 40, 60, 80 e 100%) por 1 hora cada, em temperatura ambiente sob rotação. O fígado foi então branqueado em solução de MeOH/ H_2O_2 5% por 24 horas sob refrigeração (4°C) e depois reidratado em lavagens decrescentes de metanol (MeOH 80, 60, 40 e 20%) por 1 hora cada seguido de duas lavagens em solução PBS/Tween-20 (0,2% Tween-20, 0,1% heparina e 0,02% NaN_3 em PBS) por 30 minutos cada, em temperatura ambiente sob rotação. O tecido foi então colocado em solução de permeabilização (20% DMSO, 0,2% TritonX-100, 0,3 M glicina, 0,02% NaN_3 em PBS) *overnight* e posteriormente em solução de bloqueio (5% soro de cabra, 10% DMSO, 0,2% TritonX-100, 0,02% NaN_3 em PBS) por 72 horas, a 37°C sob

rotação. O fígado foi então incubado em solução (5% soro de cabra, 5% DMSO, 0,2% Tween-20, 0,1% heparina, 0,02% NaN₃ em PBS) contendo anticorpo anti-tirosina hidroxilase (TH; Millipore, AB152, 1:2000) por 10 dias a 20°C sob rotação e posteriormente lavados em solução PBS/Tween-20, por 7 vezes de 30 minutos e deixados *overnight* em temperatura ambiente sob rotação. O tecido foi então incubado por 5 dias em solução (5% soro de cabra, 5% DMSO, 0,2% Tween-20, 0,1% heparina, 0,02% NaN₃ em PBS) contendo anticorpo secundário (Alexa Fluor 647, Invitrogen, A-21244, 1:1000) a 20°C sob rotação e posteriormente lavados em solução PBS/Tween-20 por 7 vezes de 30 minutos e deixados *overnight* em temperatura ambiente sob rotação. O fígado então foi desidratado por lavagens crescentes de metanol (MeOH 20, 40, 60, 80 e 100%) por 1 hora cada e deixados *overnight* em MeOH 100% em temperatura ambiente sob rotação. Para o clareamento, o tecido foi incubado em diclorometano (DCM) 100% por 50 minutos sob leve rotação e posteriormente incubados em éter dibenzílico (DBE) 100% até ficarem completamente transparentes. As amostras foram então armazenadas em DBE fresco até a análise. Esquema procedimental na figura 5.

As amostras foram analisadas no UltraMicroscope II (Miltényi Biotec). Os dados obtidos foram processados no *software* Imaris 9.5 (Oxford Instruments) para reconstrução 3D e análise das imagens. A técnica do 3DISCO foi realizada no Departamento de Fisiologia, Anatomia e Genética da Universidade de Oxford, Inglaterra. As amostras foram fotografadas na Universidade de Lille, França.

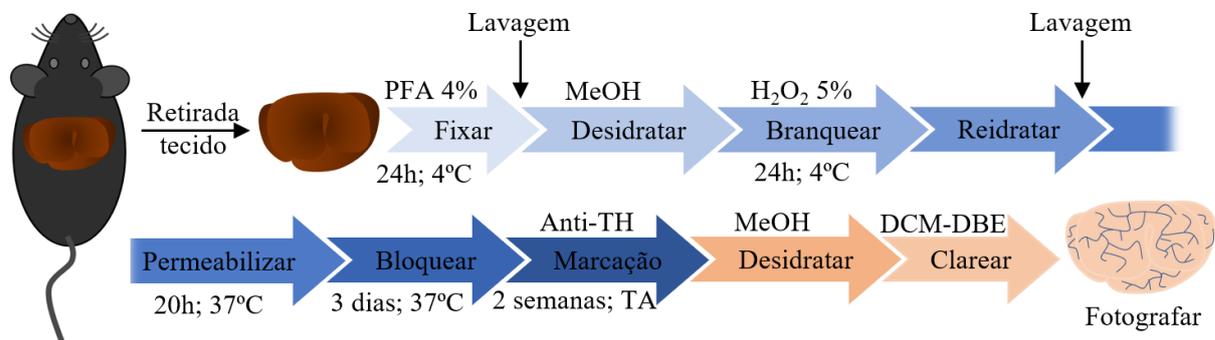


Figura 5. **Representação esquemática da técnica 3DISCO em fígados inteiros.** Descrição da figura no texto.

3.3. *Sympatectomia química*

Camundongos (C57/B16J) fêmeas foram colocadas para acasalar e tiveram sua gestação acompanhada diariamente até o parto. Para a indução da simpatectomia química, camundongos machos neonatos receberam via intraperitoneal (i.p.) no dia do nascimento (T0) e no segundo

(T2) e sétimo dia pós-natal (T7) uma injeção de 6-OHDA (Sigma-Aldrich; $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), enquanto que os animais controles receberam salina ($\text{NaCl } 0,9\%$; $1 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). Os animais permaneceram com as mães até o desmame (21 dias) e depois foram alojados em grupos ($n=5/\text{caixa}$). A partir da oitava semana de idade foram utilizados para os procedimentos experimentais. O mesmo protocolo foi utilizado para a simpatectomia química nos animais CRE-luc. A simpatectomia foi comprovada por meio da determinação do conteúdo de noradrenalina hepática.

3.4. Delineamento experimental

Os camundongos foram colocados em racks individuais no dia anterior aos procedimentos experimentais, com livre acesso a água e ração, e divididos aleatoriamente em 8 grupos ($n=5/\text{grupo}$): animais na temperatura ambiente inervados (TA IN) e simpatectomizados (TA SPT) e animais expostos ao frio inervados (FRIO IN) e simpatectomizados (FRIO SPT), por 3 e 6 horas (figura 6). A ração foi removida imediatamente antes do início dos ensaios e todos os grupos permaneceram em jejum, apenas com acesso a água. As exposições a temperatura ambiente foram realizadas em uma sala isolada no Laboratório de Controle do Metabolismo no Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, com temperatura controlada (25°C). A exposições ao frio foram realizadas na câmara fria do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, com temperatura controlada (4°C).

Ao final dos ensaios, os camundongos foram eutanasiados para coleta do sangue e do fígado. O sangue foi coletado em tubos de ensaio heparinizados para obtenção do plasma através de centrifugação (3500 rpm, 15 minutos, 4°C). O fígado foi cuidadosamente retirado e congelado em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C para posterior utilização.

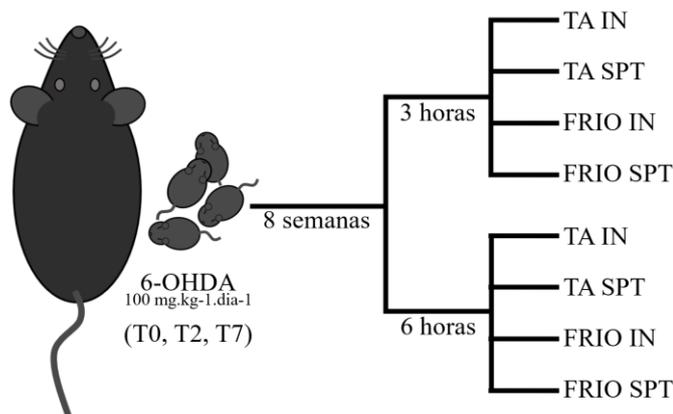


Figura 6. **Representação esquemática do delineamento experimental *in vivo*.** Descrição da figura no texto.

3.5. Determinação de parâmetros metabólicos e dosagens hormonais

3.5.1. Mensuração da glicemia

A glicemia foi mensurada pelo glicosímetro “Accu-Chek” (Roche) nos intervalos experimentais de 0, 1, 3 e 6 horas, por meio da coleta de sangue retirado de um pequeno corte na ponta da cauda do animal.

3.5.2. Dosagem de catecolaminas no fígado e plasma

A dosagem de catecolaminas hepáticas foi realizada de acordo com GAROFALO et al. (1996). Brevemente, 500 mg desse tecido foram homogeneizados (Omni TH) em 5 ml de solução de homogeneização (ácido perclórico 0,2 N, metabissulfito de sódio 1% e EDTA 1 mM), centrifugado (8000 rpm, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante reservado em um novo tubo com 50 mg de alumina previamente ativada em estufa a 100°C, por 1 hora. Para dosagem de catecolamina plasmática, o plasma armazenado em microtubos contendo metabissulfito 10% foi centrifugado e 200 µl do sobrenadante foi adicionado na solução de homogeneização com 50 mg de alumina ativada. Foi adicionada as amostras os padrões de catecolaminas e o bromidrato de 3,4-diidroxibenzilamina (Sigma-Aldrich) como padrão interno. As amostras foram agitadas durante 20 minutos na temperatura ambiente, centrifugadas (8000 rpm, 5 minutos, 4°C) e o sobrenadante aspirado e descartado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes lavando a cada passagem a alumina precipitada com 3 ml de solução de limpeza (Tris 5 mM, EDTA 0,1 mM e metabissulfito de sódio 0,1%). Após as lavagens as catecolaminas foram extraídas da alumina pela adição de 0,8ml de solução eluidora (ácido perclórico 0,1 N, EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 1mM) sob agitação de 10 minutos. Alíquotas de 500 µl das amostras assim obtidas foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC; Shimadzu Proeminence) acoplado a um detector eletroquímico (Decade Lite; Antec Scientific). Os resultados obtidos foram analisados pelo *software Class VP 6.14* (Shimadzu).

3.5.3. Determinação de glucagon e insulina plasmática

As concentrações plasmáticas de insulina (EZRMI-13K; Millipore) e glucagon (EZGLU-30K; Millipore) foram determinadas por kits comerciais de ELISA.

3.5.4. Determinação de corticosterona plasmática

As concentrações plasmáticas de corticosterona foram determinadas por radioimunoensaio. A corticosterona foi extraída por homogeneização de 25 µl de plasma com 1 ml de álcool etílico absoluto, e posteriormente secas em SpedVac (Savant SVC-100H). As amostras foram ressuspensas em 2,5 ml de tampão esteroide (fosfato dibásico 0,02 M em gelatina 0,1%) e homogeneizadas. Em um novo tubo com 500 µl de amostra, acrescentou 100 µl de tampão esteróide contendo corticosterona³H (PerkinElmer NET-182) e 100 µl de solução

tampão contendo anticorpo anti-corticosterona (Sigma Aldrich, C8784-100TST), e as amostras ficaram 15 horas em geladeira. Acrescentou 200 µl de solução tampão esteroide contendo carvão ativado 1% e dextram 0,1%, previamente deixada em agitação por 2 horas em banho de gelo. As amostras ficaram em repouso por 15 minutos em geladeira e depois foram centrifugadas (2500 rpm, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi invertido em tubos de cintilação, acrescentado líquido de cintilação, homogeneizado e posteriormente lido em contador beta (PerkinElmer). A concentração de corticosterona das amostras foi determinada por uma curva padrão deste hormônio (Sigma Aldrich; C-46148).

3.6. Conteúdo e estado de fosforilação proteica por *Western blot*

Amostras de fígados foram homogeneizadas (TissueLyzerII; 30Hz; 2 min) em 6 volumes de tampão TRIS-HCL (50mM; pH7,4; 4°C) contendo 150 mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% de SDS, inibidores de proteases (1 mM PMSF, 5µg/ml de aprotinina e 1 µg/ml de leupeptina), inibidores de fosfatases (10 mM ortovanadato de sódio, 10 mM pirofosfato de sódio e 100 mM fluoreto de sódio) e inibidores de deacetilases (1mM nicotinamida e 400 nM tricostatina A). O homogenato foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi alíquotado e armazenado em freezer - 80°C. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry (WALKER; WATERBORG; MATTHEWS, 2003). Alíquotas contendo 10-100 µg de proteína foram adicionadas tampão de *Laemmli* (SDS 4%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM, azul de bromofenol 2%, pH 6,8), aquecidas a 70°C por 10 minutos sob agitação e então submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE em sistema de mini gel vertical (BioRad) com tampão contendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,4), glicina 115 mM e SDS 0,1%, sob 100 Volts por 2 horas. As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose pelo sistema TransBlot SD Cell (BioRad) com tampão contendo Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 10% e metanol 0,2 M, pH 7,4, sob 400 mA por 30 minutos. A membrana de nitrocelulose foi incubada em solução de TBS-T (Tris-HCL 0,02 M, NaCl 0,16 M, Tween 20 0,1%, pH 7,4) com leite desnatado 10% por 1 hora. Após o bloqueio a membrana foi incubada em solução TBS-T (acrescida de albumina sérica bovina 2,5% e NaN₃ 0,01%) contendo anticorpos primários para as proteínas de interesse no sistema SNAP i.d. 2.0 (Milipore) por 15 minutos ou *overnight* a 4°C. As membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas posteriormente em solução de TBS-T com anticorpo secundário com peroxidase por 15 minutos no sistema SNAP i.d. 2.0 ou 1 hora na temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas em TBS-T e expostas ao sistema de detecção de imagem ChemiDoc XRS+ (BioRad) após a adição do reagente de

quimioluminescência (Tris-HCl 1 M, pH 8,5, luminol 250 mM, ácido cumárico 90 mM e H₂O₂ 0,01%. A análise das bandas (densitometria) foi realizada no *software* ImageJ. A β -actina foi utilizada como controle interno do conteúdo de proteínas totais. As formas fosforiladas foram corrigidas pelas formas totais das proteínas ou pela β -actina. Os resultados obtidos foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 1 (100%). A tabela 1 contém os anticorpos utilizados e suas concentrações.

Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados para *Western blot* e suas concentrações.

Anticorpo	Código	Diluição	Anticorpo	Código	Diluição
AKT	#9272	1/500	FoxO1/3 Thr ^{24/32}	#9464	1/1000
AKT Ser ⁴⁷³	#9271	1/1000	FoxO3	#2497	1/1000
AKT Thr ³⁰⁸	#9275	1/500	HDAC4/5/7 Ser ^{246/259/155}	#3443	1/1000
ATF2 Thr ^{69/71}	#9225	1/200	HDAC4/5/7 Ser ^{632/661/486}	#3424	1/750
CaMKII	sc-5306	1/500	JNK	#9252	1/1000
CaMKII Thr ²⁸⁶	#12716	1/500	JNK Thr ¹⁸³ Thr ¹⁸⁵	#9251	1/1000
CREB	Salk Institute	1/1000	LKB1 Ser ⁴³¹	Salk Institute	1/1000
CREB Ser ¹³³	Salk Institute	1/1000	P38	#9212	1/1000
CRTC	Salk Institute	1/1000	P38 Thr ¹⁸⁰ Thr ¹⁸²	#9211	1/1000
CRTC-2 Ser ¹⁷¹	Salk Institute	1/1000	PEPCK	sc-32879	1/10000
CRTC-2/3 Ser ^{275/273}	Salk Institute	1/1000	STAT5 Tyr ⁶⁹⁴	#4322	1/500
FoxO Lys ^{259/262/271}	sc-49437	1/500	Substratos-p PKA	#9621	1/1000
FoxO1	sc-11350	1/1000	Substratos-p PKC	#2261	1/1000
FoxO1 Ser ²⁵⁶	sc-101681	1/500	β -actina	sc-81178	1/5000

Anticorpos do Salk Institute foram gentilmente cedidos pelo Dr. Marc Montminy.

3.7. Expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

O ácido ribonucleico (RNA) foi extraído do fígado de camundongos por Trizol (Invitrogen), purificado (RNeasy; QIAGEN) e quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop One/One^C; Thermo Fisher). Alíquota contendo um 1 μ g de RNA foi tratada com DNase, acrescentado Oligo dT (20 pmols; Invitrogen) e dNTPmix (10 mM; Promega) em água DEPC (água milli-Q tratada com dietil-pirocarbonato 0,01% autoclavada). Para geração dos DNA complementar (DNAC), as amostras foram aquecidas a 65°C por 5 minutos, resfriadas, seguida de adição da enzima transcriptase reserva (Super Script IV; Invitrogen) e submetidas a um ciclo de 23°C (10 minutos), 55°C (10 minutos), 80°C (10 minutos) e resfriadas (termociclador C1000 *Touch*, BioRad). Para avaliar a expressão gênica, as amostras de DNAC foram submetidas a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) utilizando SYBR Green (Invitrogen) com Carboxi rodamina (ROX) como controle interno, acrescido dos *primers* (IDT) para detecção dos genes de interesse (tabela 2). Os genes de interesse foram amplificados e adquiridos no sistema ABI Prism 7500 (Perkin-Elmer) seguindo os seguintes parâmetros: 50°C

(2 minutos), 95°C (10 minutos) e 40 ciclos de 95-60°C (15 segundos/1 minuto). Os dados gerados foram analisados no *software* ABI Prism/7500 system SDS. O gene de Rpl32 (proteína ribossomal 32) foi utilizado como controle interno da expressão dos genes de interesse. Os resultados obtidos foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 1 (100%).

Tabela 2. **Relação da sequência dos primers utilizados para RT-PCR.**

Gene	Forward	Reverse
Nr4a1	AGC TTG GGT GTT GAT GTT CC	AAT GCG ATT CTG CAG CTC TT
Rpl 32	TCT GGT GAA GCC CAA GAT CG	CTC TGG GTT TCC GCC AGT TT

A – adenina; C – citosina; G – guanina; T- timina.

3.8. Avaliação da atividade transcricional de CREB *in vivo*

Camundongos CRE-luc, inervados e simpatectomizados expostos ao frio e à temperatura ambiente, por 3 e 6 horas, e camundongos CRE-luc inervados e tratados uma hora antes das análises com dose única de noradrenalina (1 mg/kg; i.p.) foram anestesiados e mantidos em isofluorano (2,5%). Os animais receberam via i.p. solução de D-luciferina (100 mg. kg⁻¹; Biosynth AG) e após 5 minutos foram dispostos em decúbito dorsal dentro da câmara escura do sistema de aquisição de imagens *in vivo* - IVIS (Xenogen). As imagens obtidas e a quantificação da luminescência foram realizadas pelo *software* Living Image (Xenogen).

3.9. Análise histológica

Fragmentos de aproximadamente 1 cm² foram cuidadosamente retirados da mesma porção do lobo direito dos camundongos, fixados em PFA 4% por 48 horas e posteriormente armazenados em álcool 70% até a inclusão. Para a inclusão em parafina o tecido foi primeiramente desidratado em uma sequência crescente de etanol, até atingir o álcool 100% e posteriormente diafanizado em uma sequência crescente de xilol, até atingir xilol 100%. Por fim o tecido ficou imerso em parafina, 60°C, por 2 horas, seguido da montagem do suporte.

Para coloração de hematoxilina e eosina (HE), os tecidos foram cortados em 5 µm, desparafinizados em xilol, hidratados em uma sequência de álcool até 70% e depois em água. Os cortes foram imersos em hematoxilina por 1 minuto seguido da eosina por 20 segundos e permaneceram imersos em água por 10 minutos para retirada do excesso de corante. As lâminas foram rapidamente passadas em uma sequência de álcool, do 70% a 100%, seguida de passagens rápidas no xilol. As lâminas foram armazenadas em temperatura ambiente até suas análises e fotos em microscópio.

3.10. Análise estatística

Os dados apresentados representam ao menos 3 tratamentos experimentais independentes analisados primeiramente de forma separada e posteriormente foi realizado uma análise global. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média) e foram submetidos a análise estatística adequada considerando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Para análises de dados bidirecionais foi utilizado ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Holm-Sidak*. Análises entre dois grupos foi utilizado o teste *t-Student*.

Resultados

4. Resultados

4.1. Arquitetura da inervação noradrenérgica intra-hepática

Com o objetivo de investigar a arquitetura da inervação noradrenérgica no fígado de camundongos foi utilizada a técnica de 3DISCO para marcação e visualização dessas fibras. Averiguou-se que os nervos simpáticos que adentram ao fígado ficam restritos à vasculatura e, anatomicamente, assemelham-se a uma teia ou rede ao redor dos vasos, não adentrando ao parênquima hepático, como demonstrado na figura 7.

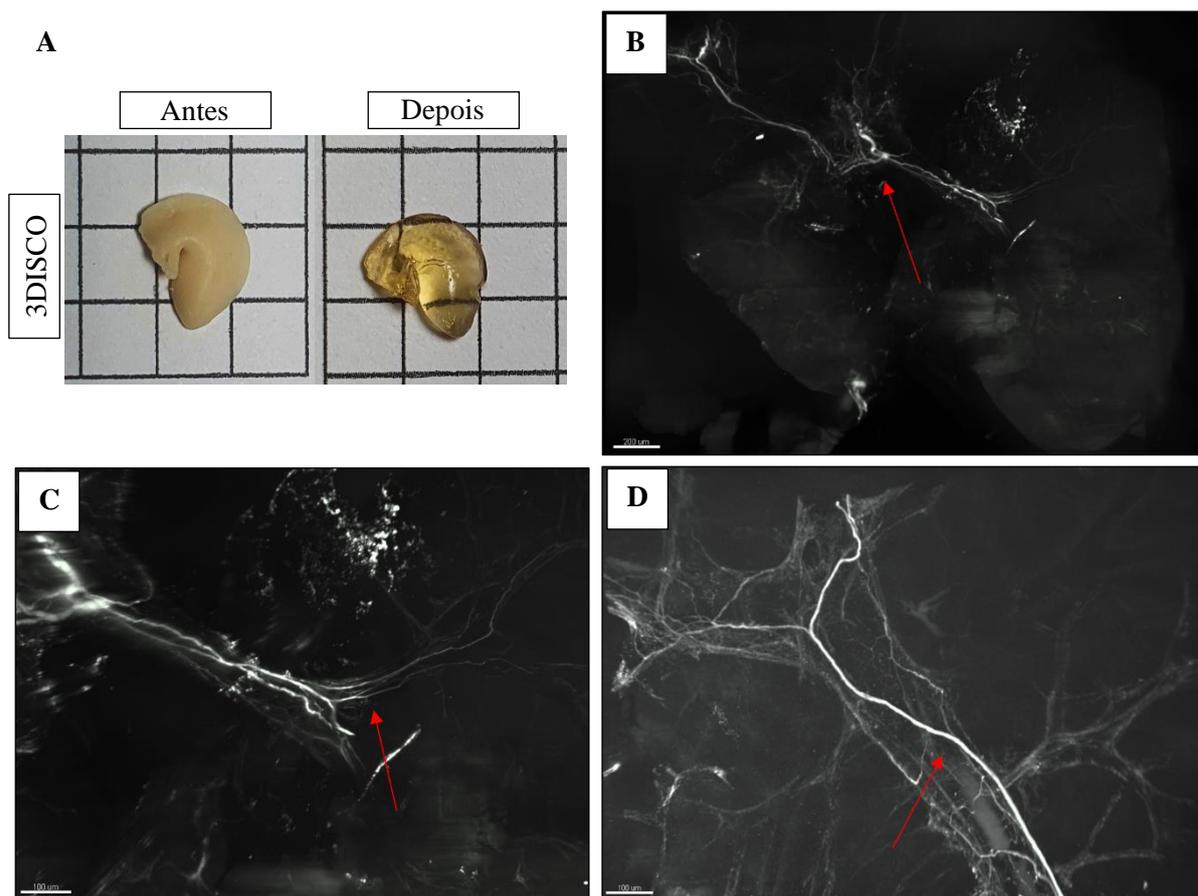


Figura 7. **Reconstrução 3D das fibras simpáticas em fígado de camundongos marcados com TH (branco).** (A) Antes e depois do 3DISCO. (B) Fígado inteiro. Seta vermelha indica a região do hilo onde chegam as fibras noradrenérgicas. (C) Fibras seguindo os vasos sanguíneos que vão irrigar os lóbulos, indicados pela seta vermelha. (D) Íntima relação das fibras simpáticas ao redor dos vasos sanguíneos assemelhando a uma rede/teia indicado pela seta vermelha. Magnificação 0,63x, intervalo 3 μ m, \approx 900 imagens em cada amostra.

4.2. Caracterização do modelo de estresse térmico e da simpatectomia química

Com o objetivo de caracterizar o modelo experimental, verificou-se se o modelo de estresse térmico foi capaz de ativar os terminais noradrenérgicos hepáticos e se a simpatectomia química estava sendo eficiente em abolir essa resposta. Para isso, avaliou-se o conteúdo de noradrenalina no fígado em camundongos inervados e simpatectomizados na temperatura ambiente e no frio por 3 e 6 horas. Os resultados indicam que o estresse térmico aumentou o conteúdo de noradrenalina hepático nos animais inervados expostos ao frio por 3 e 6 horas quando comparados a animais mantidos na temperatura ambiente. A simpatectomia química por 6-OHDA foi capaz de abolir o conteúdo hepático de noradrenalina nos animais no frio e na temperatura ambiente, em ambos os tempos (figura 8a).

Foi também investigado se a simpatectomia causava algum dano estrutural no fígado por meio da avaliação histológica do tecido. As análises histológicas do tecido indicam que a simpatectomia química por 6-OHDA não gerou nenhuma alteração na estrutura do fígado ou na morfologia dos hepatócitos quando comparados aos dos camundongos inervados (figura 8b).

Dando continuidade à caracterização do modelo, foi averiguado o perfil glicêmico nos animais inervados e simpatectomizados expostos ao frio. Como é possível observar na curva glicemia (figura 8c) e na área sob a curva (figura 8d), o estresse térmico foi capaz de aumentar a glicemia dos camundongos após 1 hora, e o efeito perdurou durante as 6 horas de exposição, enquanto a simpatectomia inibiu essa resposta. Nota-se que a simpatectomia não interferiu na glicemia em animais mantidos na temperatura ambiente.

Em um estudo anterior de nosso laboratório, verificou-se que o estresse térmico em camundongos elevou a atividade enzimática e expressão gênica da G6Pase e da PEPCK, duas enzimas chaves da neoglicogênese (DELFINO, 2018). Em total concordância com esses dados, o presente trabalho mostra que o conteúdo da PEPCK também foi significativamente aumentado no fígado de animais inervados expostos ao frio por 3 e 6 horas, sendo este efeito completamente bloqueado nos animais simpatectomizados (figura 8e).

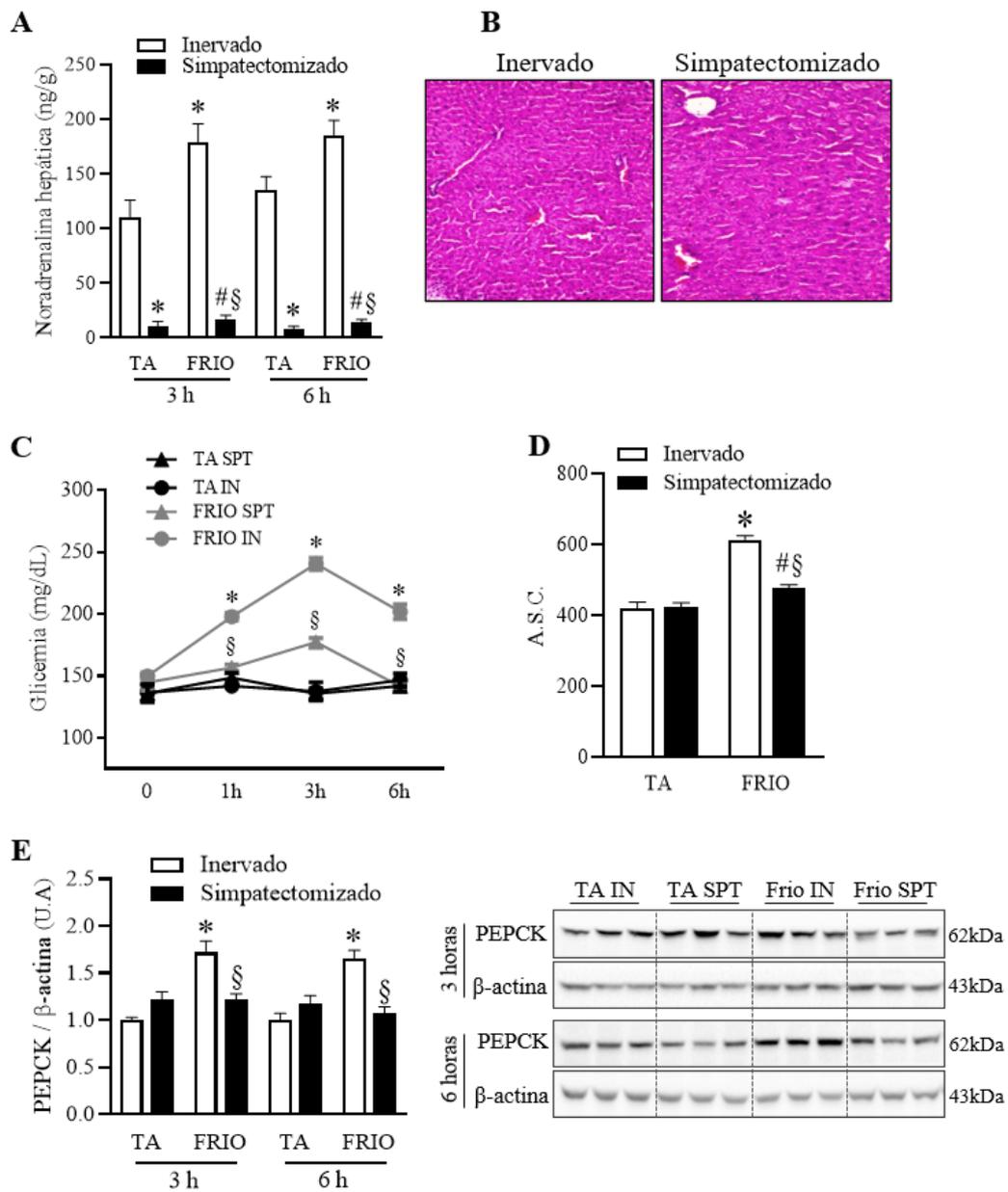


Figura 8. Caracterização do modelo experimental de exposição ao frio por 3 e 6 horas em camundongos inervados e simpatectomizados por 6-OHDA. (A) Conteúdo de noradrenalina hepática. (B) Coloração HE em fígado. (C) Curva glicêmica e; (D); área sob a curva (A.S.C.). (E) Conteúdo de PEPCK. Ao lado direito, figuras representativas dos *Western blots*. A β -actina foi utilizada como controle interno. Os valores são expressos como média \pm EPM. * vs TA inervado; # vs TA simpatectomizado; § vs frio inervado. ANOVA *two-way* seguido de pós teste de *Holm-Sidak*.

Em seguida, foi avaliado se a simpatectomia interfere com a secreção de hormônios que sabidamente regulam a neoglicogênese. O estresse térmico aumentou as concentrações plasmáticas de corticosterona e glucagon, no tempo de 3 e 6 horas, tanto em animais inervados como em simpatectomizados. Na exposição ao frio por 3 horas, os camundongos simpatectomizados apresentaram concentrações plasmáticas de glucagon maiores em relação

aos inervados. Os valores da concentração sérica de insulina foram significativamente reduzidos em animais inervados expostos a 3 horas de frio, mas este efeito não foi alterado pela simpatectomia. No tempo de 6 horas, verificou-se uma tendência à redução da insulinemia nos animais inervados expostos ao frio e uma redução significativa destes valores nos animais simpatectomizados. Por outro lado, as catecolaminas plasmáticas, adrenalina e noradrenalina, não foram moduladas pelo estresse térmico e/ou pela simpatectomia em 3 e 6 horas (tabela 3). O estado de fosforilação de STAT5 foi utilizado como marcador indireto da ação hepática do GH e como pode ser verificado a exposição ao frio reduziu a fosforilação em *Tyr⁶⁹⁴* de STAT5, tanto em animais inervados como em simpatectomizados quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 9).

Tabela 3. Concentrações plasmáticas de hormônios em camundongos simpatectomizados e inervados expostos ao frio e/ou à temperatura ambiente (TA) por 3 e 6 horas.

	3 horas				6 horas			
	TA		Frio		TA		Frio	
	Inervado	Simpatec	Inervado	Simpatec	Inervado	Simpatec	Inervado	Simpatec
Corticosterona ($\mu\text{g/dl}$)	4,7 \pm 0,6	0,65 \pm 0,07	10,8 \pm 1,1*	12,4 \pm 2,7 [#]	5,1 \pm 2,2	5,1 \pm 1,4	13,5 \pm 3,5*	13,3 \pm 1,8 [#]
Glucagon (pg/ml)	16,9 \pm 3,7	12,5 \pm 0,3	29,9 \pm 5,6*	113 \pm 23,1 ^{#§}	10,5 \pm 1,3	25,0 \pm 9,6	65,5 \pm 9,9*	68,4 \pm 9,1 [#]
Insulina (ng/ml)	0,84 \pm 0,06	0,66 \pm 0,08	0,41 \pm 0,04*	0,54 \pm 0,15	0,5 \pm 0,08	0,77 \pm 0,15	0,26 \pm 0,01	0,25 \pm 0,03 [#]
Adrenalina (ng/ml)	5,2 \pm 0,4	4,0 \pm 0,8	5,7 \pm 1,7	5,8 \pm 1,3	5,8 \pm 0,2	3,8 \pm 0,8	4,4 \pm 0,8	5,0 \pm 0,9
Noradrenalina (ng/ml)	7,0 \pm 1,3	4,2 \pm 1,5	10,0 \pm 2,9	6,6 \pm 1,6	5,9 \pm 0,9	4,5 \pm 0,8	6,8 \pm 0,7	5,3 \pm 1,1

Os valores são expressos como média \pm EPM. * vs TA inervado; # vs TA simpatectomizado; § vs frio inervado. ANOVA *two-way* seguido de pós teste de *Holm-Sidak*.

Em conjunto, esses dados indicam que o estresse térmico, de até 6 horas, é capaz de ativar as fibras simpáticas noradrenérgicas do fígado de camundongos que, por sua vez, podem contribuir para o aumento do conteúdo da PEPCCK, muito provavelmente por meio da ativação do programa gênico desta enzima chave da neoglicogênese (DELFINO, 2018), levando assim ao aumento da glicemia plasmática. Em paralelo, o estresse térmico aumenta a secreção hormonal de corticosterona e de glucagon, mas reduz a de insulina e possivelmente do GH, sendo todos estes efeitos não modulados pelo simpático.

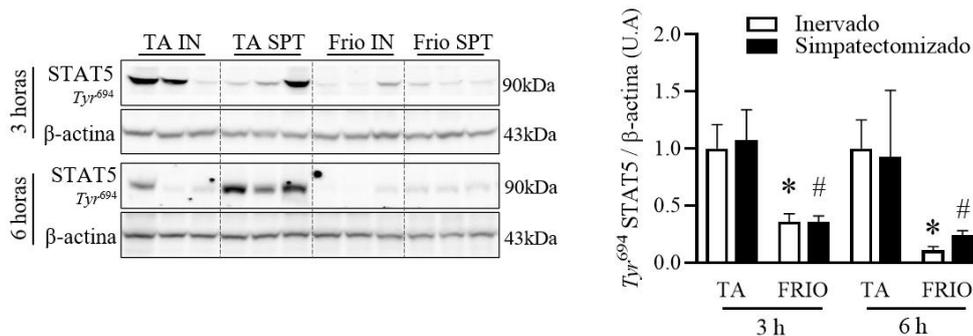


Figura 9. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, na fosforilação de Tyr^{694} STAT5 em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados. Ao lado esquerdo, figuras representativas dos Western blots. A β -actina foi utilizada como controle interno. Os valores são expressos como média \pm EPM. * vs TA inervado; # vs TA simpatectomizado; § vs frio inervado. ANOVA *two-way* seguido de pós teste de *Holm-Sidak*.

4.3. Participação de CREB na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo frio.

Com o objetivo de investigar se CREB estaria envolvido na ativação do programa gênico (expressão de genes e tradução de proteínas) da neoglicogênese hepática induzida pela inervação noradrenérgica, durante a exposição ao frio, analisou-se o conteúdo hepático de Ser^{133} CREB. Os resultados mostram que camundongos expostos ao frio por 3 e 6 horas apresentam aumento no estado de fosforilação nesse resíduo quando comparados aos animais na temperatura ambiente. A simpatectomia aboliu o aumento de Ser^{133} CREB hepático nos camundongos expostos ao frio (figura 10a). Por outro lado, o estado de fosforilação de $Thr^{69/71}$ ATF-2 (Fator de ativação transcricional 2), membro da família de fatores transcricionais de CREB, foi reduzido durante a exposição ao frio de 3 horas em camundongos inervados e simpatectomizados. O frio de 6 horas não alterou o estado de fosforilação de ATF-2 (figura 10b). O mesmo padrão de modulação que ocorreu no estado de fosforilação de CREB foi observado na expressão gênica de *Nr4a1* (Membros da família de receptores nucleares órfãos do grupo A1), gene alvo de CREB, no qual o estresse térmico de 3 e 6 horas estimulou a transcrição desse gene e a simpatectomia aboliu essa resposta (figura 10c).

Como uma estratégia de avaliar indiretamente a atividade transcricional de CREB em resposta ao estresse térmico e sua possível modulação pelo SNS, camundongos CRE-luc inervados e simpatectomizados foram expostos ao frio por 3 e 6 horas. O estresse térmico de 3 horas levou ao aumento de cerca de 100X da atividade transcricional de CREB, enquanto que em 6 horas, este aumento foi da ordem de 1000X. A simpatectomia foi capaz de atenuar a atividade transcricional de CREB durante o estresse térmico de 3 e 6 horas (figura 10d). O tratamento com noradrenalina foi utilizado como controle positivo da atividade transcricional

de CREB. A administração de uma única injeção i.p. de noradrenalina foi capaz de aumentar, após 1 hora, a glicemia (figura 10e) e a atividade transcrional de CREB no fígado (figura 10f) dos animais CRE-luc.

Em conjunto, esses resultados nos permitem sugerir que o SNS ativa CREB no fígado de camundongos expostos ao frio.

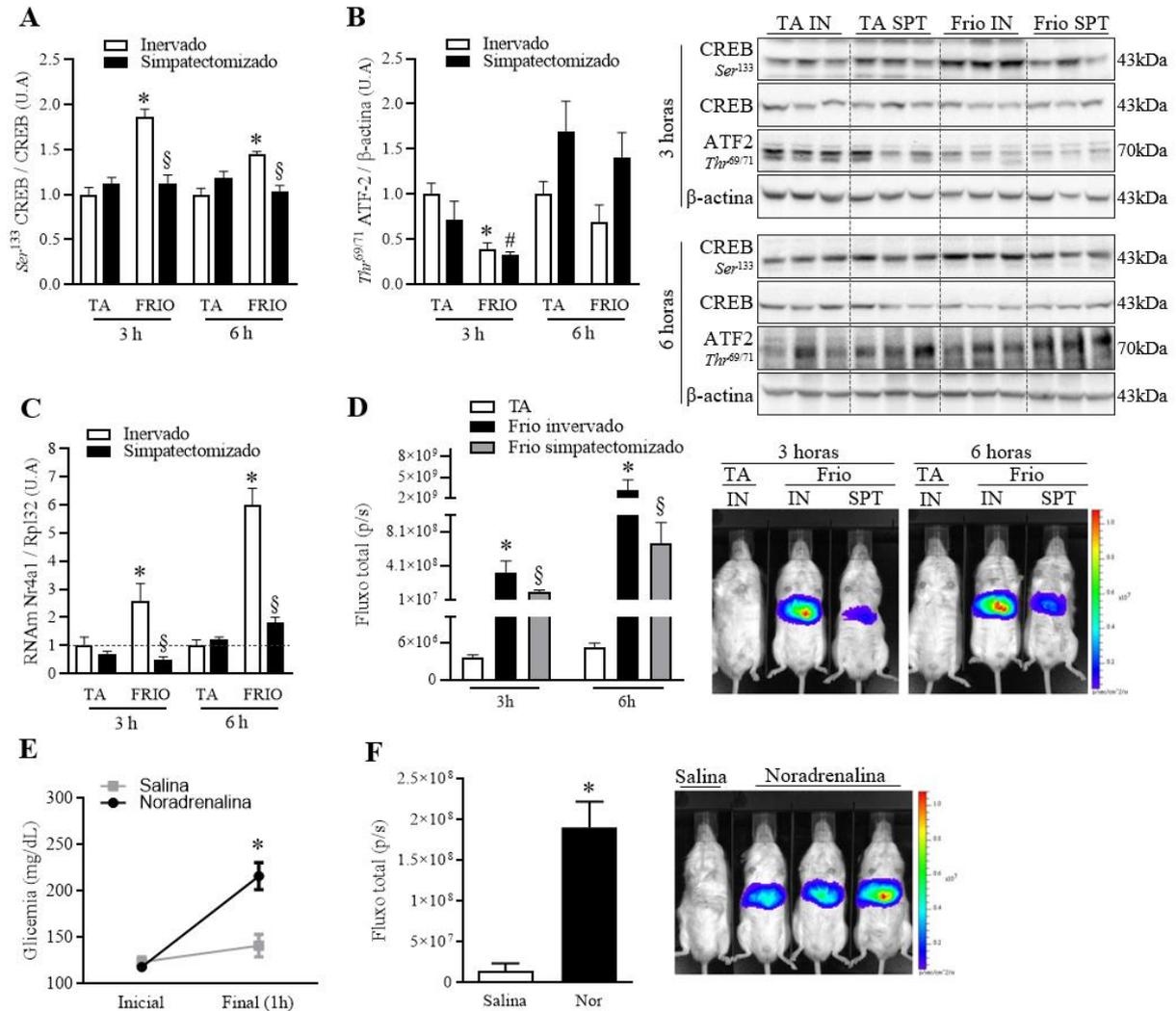


Figura 10. Participação de CREB na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo frio (3 e 6 horas) em camundongos inervados e simpatectomizados. Conteúdo e/ou estado de fosforilação de (A) *Ser*¹³³ CREB e (B) *Thr*^{69/71} ATF-2; ao lado direito, figuras representativas dos *Western blots*. A forma total da proteína ou β -actina foram utilizadas como controle interno. (C) Expressão gênica de *Nr4a1*. (D) Atividade transcrional de CREB em camundongos CRE-luc inervados e simpatectomizados; ao lado direito, imagem representativa. (E) Glicemia e (F) atividade transcrional de CREB em camundongos CRE-luc tratados com 1 injeção de noradrenalina (1mg/kg; i.p.); ao lado direito, imagem representativa. Os valores são expressos como média \pm EPM. * vs TA inervado; # vs TA simpatectomizado; § vs frio inervado. ANOVA *two-way* seguido de pós teste de *Holm-Sidak* (*Western blot*); Teste *t-Student* (CRE-luc).

4.4. Participação de CRTC-2/3 na ativação da neoglicogênese hepática pelo frio.

Em seguida, avaliou-se o estado de fosforilação do CRTC-2 e CRTC-3 no fígado de animais inervados e simpatectomizados expostos ao frio ou à temperatura ambiente. Ao contrário de CREB, sabe-se que seus coativadores, CRTCs, são ativados por mecanismos de defosforilação. A exposição ao frio por 3 e 6 horas levou à defosforilação de *Ser*¹⁷¹ CRTC-2 tanto em camundongos inervados como em simpatectomizados, quando comparados aos seus respectivos controles na temperatura ambiente (figura 11a). Verificou-se que o estresse térmico de 6 horas também provocou defosforilação do resíduo de *Ser*²⁷⁵ CRTC-2 em animais inervados e que a simpatectomia aboliu este efeito. No tempo de 3 horas, camundongos simpatectomizados expostos ao frio apresentaram aumento no estado de fosforilação desse resíduo de CRTC-2 (figura 11b). Com relação ao CRTC-3, observou-se que o estresse térmico de 3 e 6 horas não alterou seu estado de fosforilação. Entretanto, é interessante notar que, em ambos os tempos de estresse térmico, e no grupo mantido na temperatura ambiente, a simpatectomia aumentou a fosforilação em *Ser*²⁷³ CRTC-3 (figura 11c).

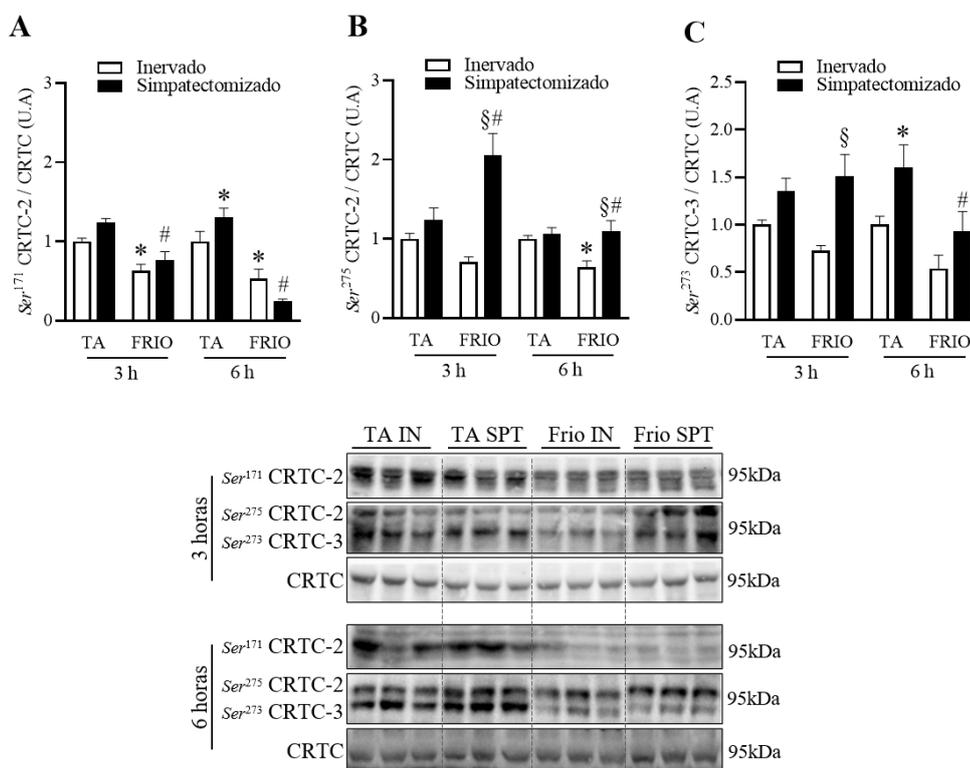


Figura 11. **Participação do CRTC-2/3 na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo frio (3 e 6 horas) em camundongos inervados e simpatectomizados.** Conteúdo e estado de fosforilação de (A) *Ser*¹⁷¹ CRTC-2; (B) *Ser*²⁷⁵ CRTC-2 e; (C) *Ser*²⁷³ CRTC-3. Abaixo, figuras representativas dos *Western blots*. O CRTC total foi utilizado como controle interno. Os valores são expressos como média \pm EPM. * vs TA inervado; # vs TA simpatectomizado; § vs frio inervado. ANOVA *two-way* seguido de pós teste de *Holm-Sidak*.

Esses resultados mostram que o estresse térmico agudo leva à ativação do CRTC-2, em ambos os resíduos (*Ser*¹⁷¹ e *Ser*²⁷⁵), e que o SNS participa desta resposta modulando o estado de fosforilação do resíduo de *Ser*²⁷⁵ no fígado de camundongos. Embora o *Ser*²⁷³ CRTC-3 não seja ativado pelo estresse térmico, os dados indicam que o simpático exerce um controle tônico estimulatório deste coativador transcricional, em situações basais e de demanda como o frio.

4.5. Participação das vias de sinalização do AMPc e Ca²⁺ na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo simpático, durante o estresse térmico.

Algumas proteínas da cascata de sinalização do AMPc foram investigadas com o objetivo de compreender melhor a transdução de sinal envolvida na mobilização dos fatores e coativadores transcricionais responsáveis pela estimulação da maquinaria neoglicogênica pelo simpático. Entre essas, verificou-se o estado de fosforilação dos substratos de PKA, a proteína ativada diretamente pelo AMPc, e 2 alvos dessa quinase, a LKB1 (Quinase hepática B1) e as HDACs de classe II (HDAC4, 5 e 7), as quais são sabidamente defosforiladas e ativadas, de forma indireta, pela PKA, assim como ocorre com CRTC-2. O estresse térmico de 3 e 6 horas foi capaz de aumentar a fosforilação dos substratos de PKA em camundongos inervados, mas a simpatectomia não alterou esta resposta, em ambos os tempos estudados (figura 12a). De forma consistente com esses resultados, foi observado que o estado de fosforilação de *Ser*⁴³¹ LKB1 foi também aumentado pelo frio, tanto em animais inervados como nos simpatectomizados, durante os períodos de 3 e 6 horas (figura 12b). A exposição ao frio por 3 horas não gerou nenhuma alteração no estado de fosforilação das HDACs de classe II, em animais inervados e simpatectomizados. Entretanto, a exposição por 6 horas, em animais inervados, causou defosforilação em *Ser*^{246/259} HDAC4/5 e *Ser*¹⁵⁵ HDAC7 e a simpatectomia foi capaz de abolir essa resposta apenas em *Ser*¹⁵⁵ HDAC7, quando comparados aos seus respectivos controles na temperatura ambiente (figura 12c e 12d).

Em conjunto, esses dados indicam que o estresse térmico agudo é capaz de ativar a cascata da sinalização do AMPc levando à ativação da PKA, que por sua vez pode fosforilar CREB e ativar seus coativadores CRTCs e, paralelamente, ativar as HDACs de classe II após 6 horas de estresse térmico. Entretanto, como a simpatectomia não alterou de forma significativa a fosforilação dos resíduos da PKA promovida pelo frio, sugere-se que CREB seja modulado pelo SNS por uma via de sinalização não relacionada ao AMPc.

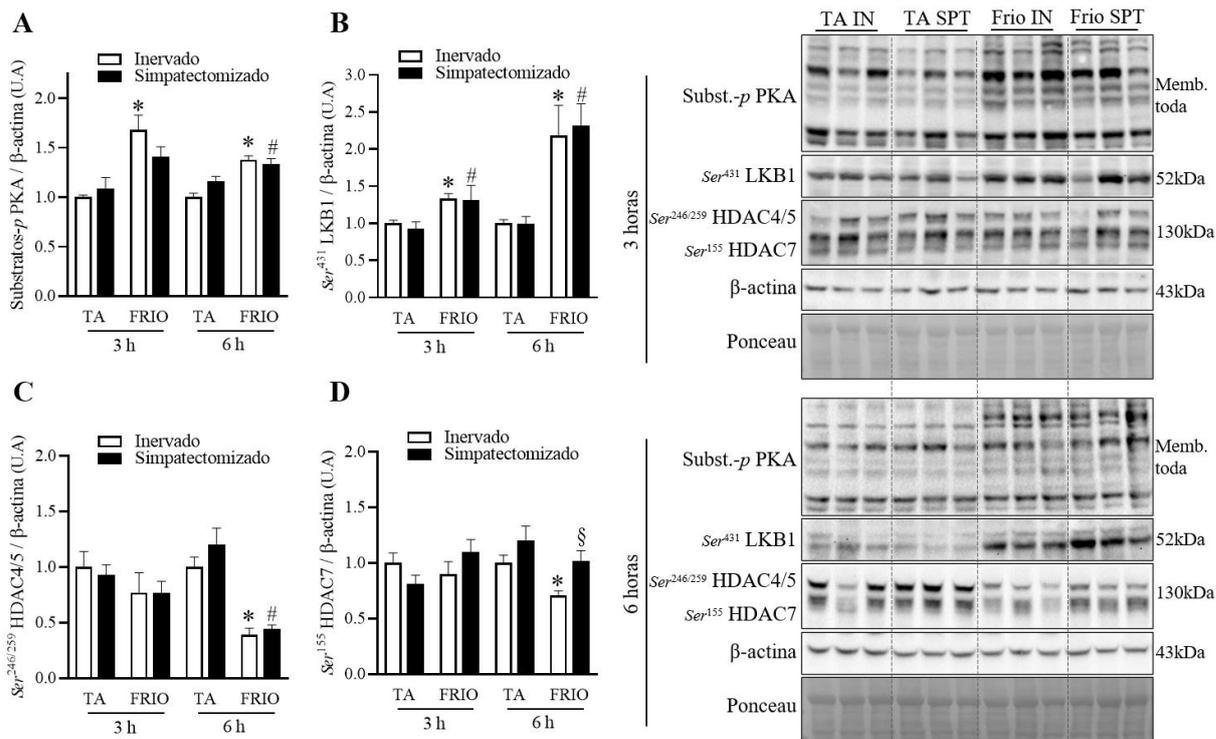


Figura 12. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, em proteínas intermediárias da via de sinalização do AMPc, em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados. Estado de fosforilação de (A) substratos de PKA; (B) Ser^{431} LKB1; (C) $Ser^{246/259}$ HDAC4/5 e; (D) Ser^{155} HDAC7. Ao lado direito, figuras representativas dos *Western blots*. A β -actina foi utilizada como controle interno. Os valores são expressos como média \pm EPM. * vs TA inervado; # vs TA simpatectomizado; § vs frio inervado. ANOVA *two-way* seguido de pós teste de *Holm-Sidak*.

Com a finalidade de investigar o envolvimento da transdução de sinal desencadeada pelo Ca^{2+} , verificou-se o estado de fosforilação dos substratos de PKC, de CaMKII, uma proteína que, sabidamente, ativa CREB e de resíduos de fosforilação das HDACs de classe II modulados por CaMKII. A exposição ao frio por 3 e 6 horas foi capaz de estimular a fosforilação dos substratos de PKC, enquanto que a simpatectomia aboliu essa resposta, em ambos os tempos estudados (figura 13a). O mesmo padrão de modulação pelo estresse térmico e pela simpatectomia foi encontrado em Thr^{286} CaMKII, nos tempos de 3 e 6 horas (figura 13b) e nos resíduos de Ser^{632} HDAC4, Ser^{661} HDAC5 e Ser^{486} HDAC7, no tempo de 3 horas. Após 6 horas, esses resíduos de HDACs de classe II não foram alterados pelo frio ou pela simpatectomia (figura 13c, 13d e 13e).

Portanto, o presente trabalho sugere que o estresse térmico é capaz de ativar a cascata de sinalização de Ca^{2+} como pode ser evidenciado pelo aumento dos substratos fosforilados de PKC e pela ativação da CaMKII, a qual poderia fosforilar e ativar CREB assim como fosforilar e inativar as HDACs. Como a simpatectomia bloqueou todas essas respostas mediadas pelo

frio, sugere-se que o complexo CREB/CRTC-2 esteja sendo ativado pelo SNS por uma via dependente de Ca^{2+} .

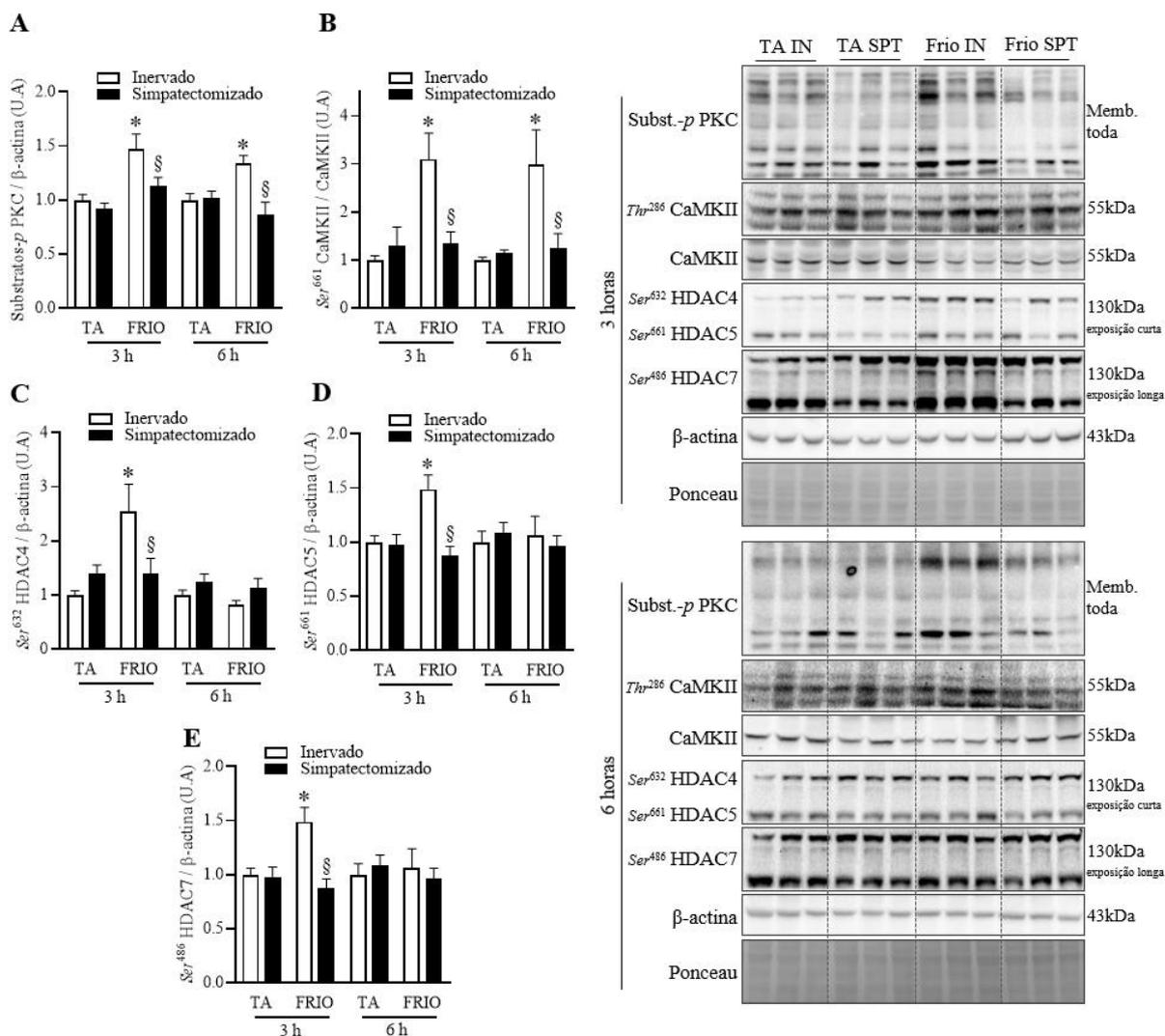


Figura 13. Efeito do estresse térmico ($4^{\circ}C$), durante 3 e 6 horas, em proteínas intermediárias da via de sinalização do Ca^{2+} em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados. Conteúdo e estado de fosforilação de (A) substratos de PKC; (B) Thr^{286} CaMKII; (C) Ser^{632} HDAC4; (D) Ser^{661} HDAC5 e; (E) Ser^{486} HDAC7. Ao lado direito, figuras representativas dos *Western blots*. A forma total da proteína ou β -actina foram utilizadas como controle interno. Os valores são expressos como média \pm EPM. * vs TA inervado; # vs TA simpatectomizado; § vs frio inervado. ANOVA *two-way* seguido de pós teste de *Holm-Sidak*.

Para investigar uma possível participação de AR $\alpha 2$ verificou-se o estado de fosforilação de Thr^{183} Tyr^{185} JNK (ROSSI et al., 2018). A exposição ao frio por 3 horas aumentou o estado de fosforilação dessa proteína em animais inervados e simpatectomizados. Por outro lado, a exposição de 6 horas ao frio e a simpatectomia não foram capazes de alterar o padrão de

fosforilação da JNK (figura 14). Isto sugere que a exposição aguda ao frio ativa essa via somente nas primeiras horas de estresse, mas sem participação do SNS.

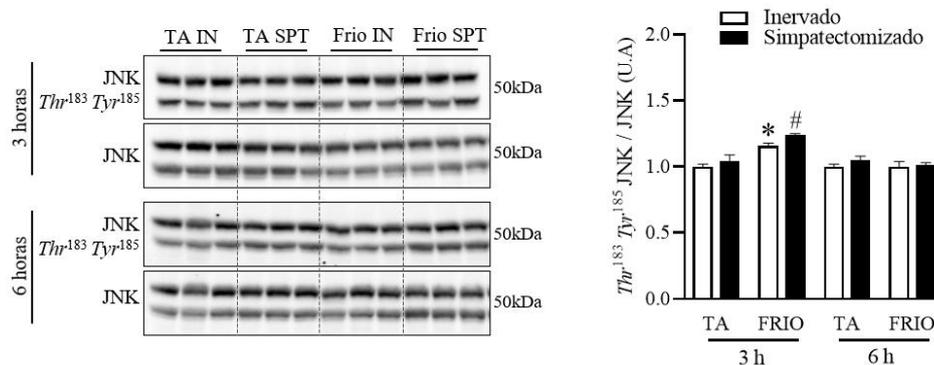


Figura 14. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, na fosforilação de $Thr^{183} Tyr^{185}$ JNK em fígado de camundongos inervados e simpatetomizados. Ao lado esquerdo, figuras representativas dos *Western blots*. A JNK total foi utilizada como controle interno. Os valores são expressos como média \pm EPM. * vs TA inervado; # vs TA simpatetomizado; § vs frio inervado. ANOVA *two-way* seguido de pós teste de *Holm-Sidak*.

4.6. Participação de *FoxO* na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo simpático, durante o estresse térmico.

Para investigar se *FoxO* estaria envolvido na ativação da neoglicogênese induzida pela inervação noradrenérgica, durante o frio, avaliou-se inicialmente o estado de fosforilação da AKT, uma proteína que, quando fosforilada, inativa *FoxO* por mecanismos de fosforilação. No tempo de 3 horas, o estresse térmico não gerou nenhuma resposta em Thr^{308} AKT, porém camundongos simpatetomizados na temperatura ambiente e no frio apresentaram redução da fosforilação desse resíduo. Por outro lado, no tempo de 6 horas, a exposição ao frio levou à redução da fosforilação de Thr^{308} AKT em animais inervados e simpatetomizados de forma semelhante. Animais inervados e simpatetomizados mantidos em temperatura ambiente por 6 horas não apresentaram alteração neste resíduo da AKT (figura 15a). Em Ser^{473} AKT, o padrão de resposta observado foi diferente. No tempo de 3 horas, o frio aumentou a fosforilação desse resíduo em animais inervados e a simpatetomia foi capaz de reduzir a fosforilação de Ser^{473} AKT no fígado de animais mantidos na temperatura ambiente e no frio de 3 horas. Em 6 horas, o estresse térmico e a simpatetomia não causaram nenhuma alteração em Ser^{473} AKT (figura 15b).

O conteúdo total de *FoxO1* foi aumentando pela exposição ao frio de 3 e 6 horas. Além disso, a fosforilação em Ser^{256} *FoxO1* foi reduzida pelo estresse térmico, em ambos os tempos.

A simpatectomia não modulou o conteúdo e nem o estado de fosforilação desse resíduo de FoxO1 nos animais expostos ao frio (figura 15c).

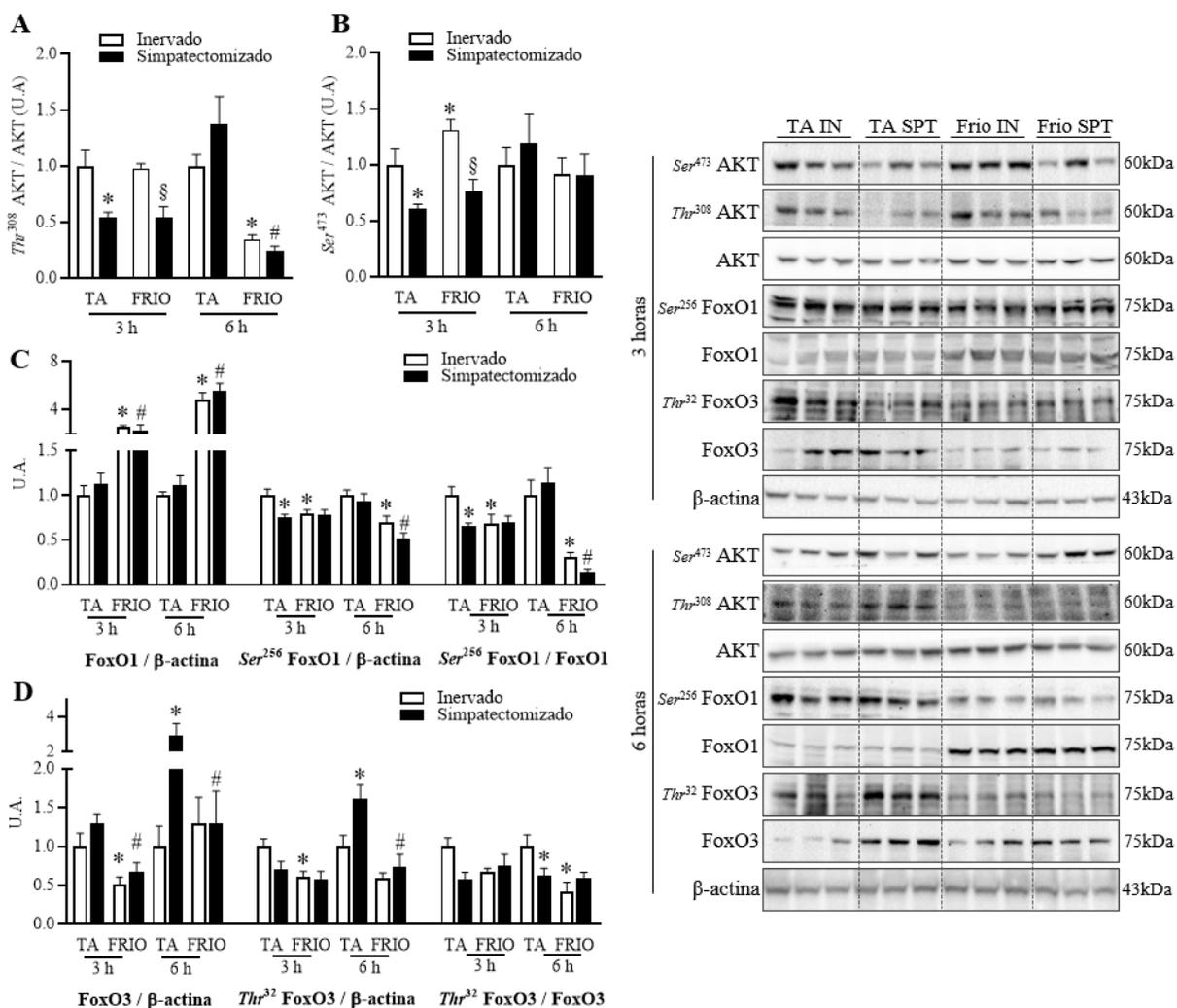


Figura 15. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, em proteínas intermediárias da via de sinalização AKT/FoxO1/3 em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados. Conteúdo e estado de fosforilação de (A) Thr^{308} AKT; (B) Ser^{473} AKT; (C) Ser^{256} FoxO1 e; (D) Thr^{32} FoxO3. Ao lado direito, figuras representativas dos *Western blots*. A forma total da proteína ou β -actina foram utilizadas como controle interno. Os valores são expressos como média \pm EPM. * vs TA inervado; # vs TA simpatectomizado; § vs frio inervado. ANOVA *two-way* seguido de pós teste de *Holm-Sidak*.

Diferentemente de FoxO1, o conteúdo total de FoxO3 foi reduzido em animais inervados e simpatectomizados expostos ao frio por 3 horas. Por outro lado, a simpatectomia aumentou o conteúdo de FoxO3 após 6 horas na temperatura ambiente e a exposição ao frio não gerou modulação deste fator transcricional. No estado de fosforilação de Thr^{32} FoxO3, o estresse térmico por 6 horas levou à redução da fosforilação desse resíduo, enquanto que no tempo de 3 horas, o frio não alterou este padrão de fosforilação (figura 15d).

Embora a análise desses dados indique que o SNS exerça um controle estimulatório da fosforilação da AKT, em situações basais e de estresse térmico nas primeiras 3 horas, não parece que FoxO seja modulado pelo simpático. As alterações de conteúdo e de fosforilação de FoxO1 e FoxO3, aqui descritas, em resposta ao frio são provavelmente decorrentes de alterações hormonais que podem contribuir para a ativação do programa gênico da neoglicogênese por este fator transcricional.

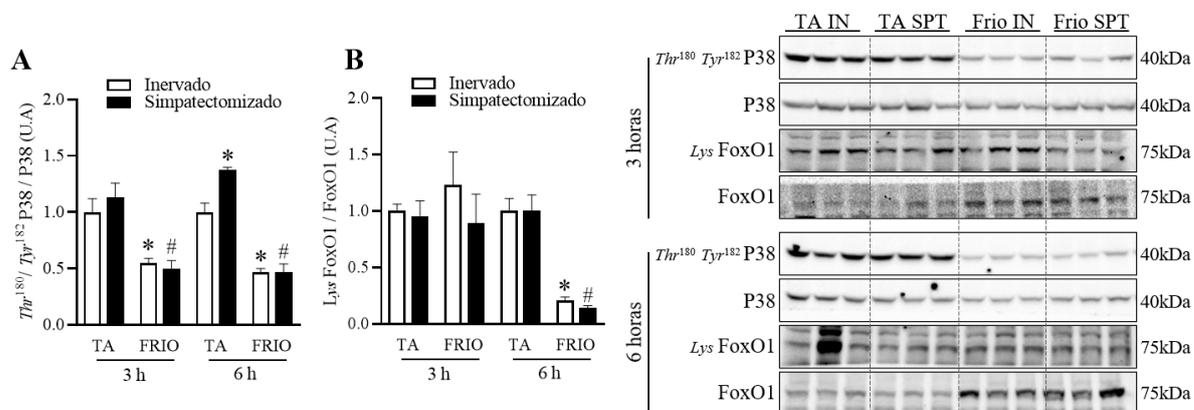


Figura 16. Efeito do estresse térmico (4°C), durante 3 e 6 horas, na fosforilação de Thr¹⁸⁰ Tyr¹⁸² P38 e na acetilação de Lys^{256/262/271} FoxO1 em fígado de camundongos inervados e simpatectomizados. Ao lado direito, figuras representativas dos Western blots. As formas totais das proteínas foram utilizadas como controle interno. Os valores são expressos como média ± EPM. * vs TA inervado; # vs TA simpatectomizado; § vs frio inervado. ANOVA two-way seguido de pós teste de Holm-Sidak.

O conteúdo e estado de fosforilação de P38 foi analisado para investigar uma possível via de ativação de FoxO1 por CaMK (OZCAN et al., 2012). O estresse térmico de 3 e 6 horas levou à redução de Thr¹⁸⁰ Tyr¹⁸² P38 em animais inervados e simpatectomizados quando comparados a seus respectivos controles (figura 16a). Apesar dos dados indicarem que o estresse térmico mobiliza a P38 para ativação de FoxO, a simpatectomia não foi capaz de modular essa resposta, sugerindo que o SNS não atua por meio desse fator transcricional para a regulação do programa gênico da neoglicogênese.

Considerando que o estresse térmico de 6 horas ativou as HDACs de classe II pela via de PKA, tornou-se interessante investigar o estado de acetilação de FoxO. De forma concordante com esses resultados, observou-se que a acetilação de FoxO foi reduzida, tanto em animais inervados como em simpatectomizados pelo estresse térmico de 6 horas, enquanto que no tempo de 3 horas não houve alteração (figura 14b). Esses dados sugerem que embora o estresse térmico leve à ativação de FoxO por mecanismos de fosforilação e de acetilação, o SNS não utiliza esse fator transcricional para exercer suas respostas hepáticas na ativação da neoglicogênese.

Discussão

5. Discussão

A produção hepática de glicose “de novo” ou neoglicogênese é um processo vital e conservado evolutivamente. Sua importância fisiológica reside no fornecimento de glicose para os diferentes órgãos e tecidos e na manutenção de um ambiente energético adequado que o organismo requer para se ajustar às diferentes situações de demanda como, por exemplo, o frio (NELSON; COX, 2014). A compreensão da fisiologia da neoglicogênese e de sua regulação é de grande interesse para a saúde humana uma vez que a desregulação desse processo faz parte da fisiopatologia de diversas doenças de grande prevalência mundial e impacto social, como a obesidade e o diabetes (DEFRONZO, 2009).

Os estudos voltados para a compreensão dos processos que regulam a produção hepática de glicose datam do surgimento da fisiologia moderna, a partir de experimentos de C. Bernard o qual demonstrou que o SNC era capaz de modular a glicemia (BERNARD, 1849). Muito se avançou nas últimas décadas sobre o entendimento dos mecanismos fisiológicos que controlam a neoglicogênese, em especial o papel do componente humoral (RUI, 2017). Apesar de componente neural ser o primeiro descrito na literatura capaz de modular a glicemia, ainda muito pouco se conhece sobre sua regulação na neoglicogênese.

Estudos clássicos das décadas de 70-90 mostraram a importância do SNS na regulação da produção hepática de glicose. Esses trabalhos destacaram a ação glicogenolítica da adrenalina, atribuindo pouca importância na modulação da maquinaria neoglicogênica. Apesar de alguns estudos dessa época relatarem papel semelhante da inervação noradrenérgica hepática, estes não foram muito difundidos e atribuíram uma pequena contribuição fisiológica à regulação neural direta quando comparada à ação do componente hormonal (BRITO et al., 1993; MIGLIORINI et al., 1989; MORGAN et al., 1982; SACCA et al., 1983). Provavelmente, pela limitação metodológica da época, pouco se avançou na investigação do papel da inervação simpática na regulação do metabolismo hepático, permanecendo a ideia de que este componente apresentava pouca importância fisiológica.

Embora se saiba que o tecido hepático seja innervado por fibras simpáticas, até hoje não há evidências científicas que descrevam de forma consistente a arquitetura intra-hepática dessas fibras. Alguns trabalhos relatam que, em roedores, a inervação noradrenérgica se restringe aos vasos, enquanto no humano essa rede é mais rica com projeções ao parênquima hepático (AKIYOSHI; GONDA; TERADA, 1998; CHIDA et al., 2005). Utilizando uma técnica de marcação e clareamento de tecidos, que permite a visualização e reconstrução em 3D das estruturas anatómicas, nosso estudo fornece, pela primeira vez, sólidas evidências de que a

circuítaria intra-hepática noradrenérgica é restrita ao redor da vasculatura hepática sem a presença de projeções neurais para o parênquima em camundongos.

A descrição anatômica dos feixes noradrenérgicos hepáticos é de grande relevância para a melhor compreensão do papel do SNS na fisiologia e fisiopatologia desse tecido. O relato neste estudo, de que o parênquima hepático de camundongos não recebe projeções simpáticas diretas, está de acordo com os trabalhos de Chida et al. (2005). Em humanos, há algumas evidências indicando rica inervação no parênquima, o que sugere que este componente neural, provavelmente, desempenhe um papel mais importante na espécie humana em comparação aos roedores. Nesse contexto, Jarhult et al. (1979) sugeriram que cirurgias abdominais deveriam evitar, se possível, danos a esse sistema, já que seu papel fisiológico é pouco compreendido.

O fato das terminações simpáticas não inervarem diretamente os hepatócitos de camundongos não significa que a noradrenalina não possa agir nessas células. É possível que este neurotransmissor alcance os hepatócitos via circulação sanguínea, uma vez que os lóbulos hepáticos recebem uma densa vascularização. Entretanto, muito pouco ainda se conhece sobre a inervação noradrenérgica hepática e sua real contribuição fisiológica, principalmente em situações de estresse, é ainda um debate na literatura. Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram, pela primeira vez, que essa inervação apresenta grande importância fisiológica na regulação da neoglicogênese hepática. Utilizando o modelo de ativação do SNS pelo estresse térmico (4°C) e a simpatectomia por 6-OHDA em camundongos, Delfino (2018) demonstrou que as primeiras horas de exposição ao frio leva ao aumento da glicemia que é acompanhado pela ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática e que a simpatectomia abole estes efeitos e leva à morte dos animais por hipoglicemia e hipotermia, após 6 horas de exposição.

Esse estudo demonstrou o papel chave do componente simpático noradrenérgico na regulação da neoglicogênese, em um modelo de estresse térmico em roedores, e abriu uma série de possibilidades investigativas. Uma delas foi compreender qual seria o papel fisiológico de CREB/CRTC-2 nesta regulação neural. Com este objetivo específico, o presente trabalho utilizou o mesmo modelo experimental de Delfino (2018) e analisou, por meio de técnicas de biologia molecular, a atividade deste complexo transcricional e de suas proteínas sinalizadoras.

Em nosso estudo camundongos inervados e simpatectomizados foram expostos ao frio (4°C) e à temperatura ambiente, por 3 e 6 horas, para mensuração da glicemia e retirada do tecido hepática para as futuras análises. Os dados iniciais conseguiram reproduzir o modelo de Delfino (2018), onde foi possível verificar que a exposição ao frio levou ao aumento da glicemia, a qual foi acompanhada pelo aumento do conteúdo hepático de noradrenalina e de

PEPCK, sendo todos esses efeitos bloqueados ou atenuados pela simpatectomia química. O modelo de estresse térmico é bastante adequado para estudos que pretendem investigar o papel fisiológico da inervação simpática direta, pois leva à ativação dos terminais noradrenérgicos em diferentes tecidos, incluindo o fígado, sem interferir na secreção de adrenalina pela adrenal (LANDSBERG; YOUNG, 1984). De fato, nossos dados mostram que, ao contrário do conteúdo hepático de noradrenalina, a concentração plasmática das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) não foi alterada pelo estresse térmico. Além disso, demonstrou-se no presente trabalho que o tratamento sistêmico com 6-OHDA não causa alterações morfológicas dos hepatócitos, reforçando a ideia de que a inervação noradrenérgica regula diretamente a neoglicogênese durante o estresse térmico sem a participação da adrenalina circulante.

A simpatectomia por 6-OHDA é um método seletivo de inibição da inervação noradrenérgica por conta da semelhança da estrutura química dessa neurotoxina com a noradrenalina (JONSSON, 1980). Sua administração sistêmica inibe irreversivelmente a liberação de noradrenalina pelos terminais neurais periféricos e, em camundongos neonatos, promove destruição seletiva e permanente dos gânglios simpáticos através da indução de estresse oxidativo, que culmina em apoptose e perda de neurônios noradrenérgicos (BLUM et al., 2001; KRUKOFF; FERNANDEZ; VINCENT, 1990; SACHS; JONSSON, 1972).

Apesar da 6-OHDA não acometer nervos parassimpáticos e o componente medular do SNS, não é um modelo específico de simpatectomia hepática, sendo que todos os tecidos periféricos inervados por fibras noradrenérgicas são afetados. Para garantir a especificidade da resposta, Delfino (2018) utilizou o modelo de desnervação cirúrgica hepática com fenol e demonstrou que ratos desnervados e expostos ao frio por 2 horas apresentaram um padrão de bloqueio do aumento da expressão de genes chaves da neoglicogênese hepática semelhante ao dos camundongos simpatectomizados. Portanto, os efeitos decorrentes da simpatectomia em nosso estudo provavelmente são decorrentes da depleção da noradrenalina hepática e não de efeitos indiretos decorrentes da simpatectomia de outros tecidos.

É bem estabelecido que o frio é uma situação fisiológica energeticamente dispendiosa, onde ocorre elevação da taxa metabólica basal para a manutenção da temperatura corpórea em animais homeotérmicos. Nessa situação, torna-se essencial a participação da termogênese dependente e independente de tremor, que envolve o músculo estriado esquelético e o tecido adiposo marrom, respectivamente. Esses tecidos termogênicos dependem principalmente da oxidação de ácidos graxos e glicose como substratos energéticos para a produção de calor. Os ácidos graxos são fornecidos pela lipólise do tecido adiposo branco e marrom, ativada diretamente pelo SNS e glucagon assim como indiretamente pela redução da insulina, que

possui ação antilipolítica (KETTELHUT; NAVEGANTES; MIGLIORINI, 2012). Já a glicose tem origem da glicogenólise hepática e muscular, mas principalmente da neoglicogênese hepática, durante a exposição a baixas temperaturas. Nessa situação, a produção de glicose “de novo” pelo fígado é favorecida pelo grande afluxo de aminoácidos provenientes da ativação da proteólise muscular e do glicerol vindo do triacilglicerol (KETTELHUT; NAVEGANTES; MIGLIORINI, 2012; MORRISON; MADDEN; TUPONE, 2014).

Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos humorais e nutricionais são essenciais para o completo entendimento do papel do componente noradrenérgico. No intuito de excluir o componente nutricional em nosso modelo, os animais permaneceram sem alimento, durante a exposição ao frio. Como os animais estão sem se alimentar e suas reservas na forma de glicogênio e gordura estão sendo rapidamente mobilizadas frente à grande necessidade energética, principalmente dos músculos esqueléticos que captam glicose com grande avidez para a realização de trabalho, os animais não conseguem sobreviver por longos períodos. Como também se tornam extremamente dependentes das ações termorregulatórias e metabólicas mediadas pelo SNS, os animais simpatectomizados não conseguem sobreviver nestas condições por mais de 8 horas (DELFINO, 2018). Devido a estas razões e ao fato da regulação neural ser uma resposta rápida, os camundongos foram expostos ao frio, por no máximo 6 horas. Uma outra vantagem na utilização de um tempo curto de estresse térmico para se investigar o papel fisiológico do simpático é a garantia de que a exposição aguda não gere adaptações fisiológicas que são comuns durante a exposição crônica ao frio (BARNETT, 1965). Delfino (2018) demonstrou que os estoques hepáticos de glicogênio já estão esgotados, após 3 horas de exposição ao frio, descartando assim a possibilidade de que o aumento da glicemia observado em nosso trabalho, a partir de 3 horas, seja decorrente da ativação da glicogenólise. Tendo em vista que o SNS sabidamente modula a secreção dos hormônios pancreáticos (JARHULT et al., 1979; RODRIGUEZ-DIAZ et al., 2011) e, segundo alguns autores pode amplificar a resposta secretória dos glicocorticoides ao ACTH (ULRICH-LAI; ARNHOLD; ENGELAND, 2006; VESCOVI et al., 1992), foram mensuradas as concentrações de insulina, glucagon e corticosterona, em nosso modelo experimental, além do estado de fosforilação de STAT5 como uma medida indireta da ação de GH.

O aumento circulante de glucagon e corticosterona juntamente com a baixa concentração de insulina encontrados no grupo de animais inervados e expostos ao frio refletem um perfil catabólico característico do estresse térmico e estão de acordo com a literatura (LI et al., 2019). Resultados semelhantes foram encontrados por Delfino (2018) que identificou aumento de glucagon e corticosterona em camundongos, após o estresse térmico, assim como

Kant et al. (1983) que também observaram aumento da corticosterona em ratos expostos ao frio. Morton et al. (2017) demonstraram que, após a exposição de ratos ao frio por 28 horas, a secreção de insulina induzida pela glicose é reduzida em 50%, porém a tolerância à glicose não é alterada em função do aumento da sensibilidade a este hormônio. Edwards e Howland (1986) demonstraram que a exposição prolongada ao frio em ratos tende a reduzir os níveis de insulina progressivamente até 6 semanas, enquanto o glucagon aumenta até à quarta semana e depois tende a voltar aos níveis basais na sexta semana. A redução do estado de fosforilação de STAT5 observada em fígado de animais expostos ao frio sugere que a sinalização hepática de GH está reduzida nessa situação fisiológica, assim como demonstrado em uma série de estudos da literatura (EISENBERG; SORRENTINO, JR.; KNIGGE, 1972; KANT et al., 1983; VESCOVI et al., 1992).

Embora este perfil hormonal possa participar de diversos ajustes metabólicos necessários, durante a exposição aguda ao frio, como, por exemplo, da ativação da resposta lipolítica, glicogenolítica ou proteolítica (KETTELHUT; NAVEGANTES; MIGLIORINI, 2012), nossos dados indicam que estes hormônios não sejam essenciais para a ativação rápida da hiperglicemia induzida pelo SNS, em resposta ao frio, durante o período investigado (entre 3 e 6 horas). Como pode ser verificado na figura 8, o aumento da glicemia foi bloqueado nos animais simpatectomizados expostos ao frio sem qualquer alteração do perfil hormonal observado nos animais inervados. *Em conjunto com os resultados obtidos por Delfino (2018), pode-se sugerir que a noradrenelina liberada pelos nervos intra-hepáticos seja a principal responsável pelo aumento da glicemia observado em camundongos expostos agudamente ao frio, sendo esta resposta provavelmente resultante da ativação do programa gênico da neoglicogênese.*

As respostas celulares desencadeadas pela noradrenalina no fígado envolvem, principalmente, duas cascatas de transdução de sinal, a do AMPc e do Ca^{2+} (EXTON, 1985; SCHMELCK; HANOUNE, 1980). Apesar de nunca ter sido demonstrado na literatura que esse neurotransmissor seja capaz de induzir a produção de glicose “de novo”, já é bem conhecido que esses segundos mensageiros, em resposta a hormônios como glucagon por exemplo, são capazes de ativar o programa neoglicogênico por meio de fatores transcricionais, entre eles CREB (GOLDSTEIN; HAGER, 2018). Portanto, foi postulado no presente trabalho que as fibras noradrenérgica hepáticas recrutam CREB para a regulação da maquinaria neoglicogênica, durante ao estresse térmico. Para verificar essa hipótese, foi analisado o estado de fosforilação desse fator transcricional, por meio de técnicas de *Western blot*. Os dados demonstram que CREB estava mais fosforilado e assim ativo, durante a exposição ao frio, e

que a simpatectomia aboliu essa resposta. Em concordância com estes resultados observou-se que o RNA mensageiro (RNAm) de Nr4a1, um gene alvo de CREB, teve sua expressão aumentada pelo estresse térmico e este efeito foi bloqueado pela simpatectomia. Para confirmar esses achados, a atividade transcricional de CREB foi avaliada por meio da intensidade de luminescência hepática emitida pelos camundongos transgênicos CRE-luc. Esses animais possuem o gene codificante da luciferase regulado pelo promotor gênico de CREB (CRE), portanto, a intensidade de luminescência emitida *in vivo* é proporcional à atividade transcricional de CREB. Assim como ocorreu com a fosforilação, o estresse térmico nos camundongos inervados foi capaz de aumentar a atividade de transcrição de CREB, a qual foi atenuada pela simpatectomia. O mediador desta resposta transcricional ao frio é provavelmente a noradrenalina liberada pelos nervos simpáticos uma vez que resposta semelhante foi observada 1 hora após a injeção de noradrenalina exógena em um grupo de animais mantidos em temperatura ambiente.

A avaliação da atividade transcricional de CREB por meio desses animais transgênicos é uma medida indireta, já que outros membros dessa família de fatores de transcrição bZip (*basic leucine zipper*), como o ATF-1/2, podem se ligar ao promotor CRE e assim transcrever luciferase (LUO et al., 2012). Entretanto, o estado de fosforilação de ATF-2 encontrado nos animais expostos ao frio não foi alterado ou modulado pela simpatectomia, o que aparentemente exclui a participação desse fator transcricional. Em conjunto, *esses dados sugerem que CREB esteja envolvido na ativação da neoglicogênese hepática induzida pelo componente noradrenérgico, durante o estresse térmico* (ver figura 10 e 17). Embora o fluxo neoglicogênico nunca tenha sido avaliado nesse modelo experimental, Delfino (2018) observou que as atividades enzimáticas e o RNAm da G6Pase e PEPCK, dois alvos de CREB, foram aumentadas pelo estresse térmico e foram bloqueadas ou atenuadas pela simpatectomia, em camundongos. Porém, a real participação de CREB na ativação desses genes deve ser confirmada em futuros estudos que avaliem se, na sua ausência, o estresse térmico conseguiria estimular a via neoglicogênica.

Além da fosforilação de CREB, outro evento de grande importância na ativação do programa transcricional da neoglicogênese hepática é a ativação por defosforilação de CRTC (GOLDSTEIN; HAGER, 2018). Os dados mostram que o estresse térmico aumentou a defosforilação de CRTC-2 e, possivelmente, a sua translocação para o núcleo. Interessante notar que embora ambos os resíduos de CRTC-2 (*Ser²⁷⁵* e *Ser¹⁷¹*) tenham sido ativados pelo frio, a simpatectomia aboliu apenas a fosforilação do resíduo de *Ser²⁷⁵*, enquanto o resíduo de *Ser¹⁷¹* não sofreu alteração. Esses dados nos permitem sugerir que a ativação do CRTC-2, no resíduo

de Ser¹⁷¹, foi provavelmente mediada pelo glucagon, um hormônio que se encontrava elevado no plasma dos animais expostos ao frio e que, sabidamente, ativa CRTC-2 por meio da defosforilação desse resíduo, via inibição de SIK promovida pela PKA, em fígado de animais jejuados (ALTAREJOS; MONTMINY, 2011). O fato da secreção de glucagon e da defosforilação de CRTC-2 Ser¹⁷¹ não terem sido alterados pela simpatectomia reforçam esta possibilidade. As evidências também indicam que o SNS modula a atividade de CRTC-2 por meio do resíduo Ser²⁷⁵, o qual é regulado pela calcineurina, uma fosfatase que é ativada pela elevação citosólica de Ca²⁺ e defosforila CRTC-2 nesse resíduo. *Esses dados sugerem que a ação simpática sobre o controle de CRTC-2 no fígado de camundongos expostos ao frio ocorre por meio da sinalização da via de Ca²⁺ e consequente ativação da calcineurina fosfatase* (ver figura 11 e 17).

Embora CRTC-2 seja o mais expresso no fígado e de maior importância na regulação do neoglicogênese, não se pode descartar o papel de CRTC-3 (ALTAREJOS; MONTMINY, 2011). Inicialmente caracterizado no tecido adiposo branco pela importância na modulação do metabolismo lipídico, Ravnskjaer et al. (2013) demonstraram que o CRTC-3 é capaz de regular o programa neoglicogênico hepático e que, na falta de CRTC-2, ele pode compensar seus efeitos. Os resultados aqui obtidos demonstraram que o estresse térmico não foi capaz de induzir a defosforilação de Ser²⁷³ CRTC-3, porém a simpatectomia foi capaz de induzir uma maior fosforilação nesse resíduo preferencialmente modulado por PKA. Portanto, *embora CRTC-3 não participe da resposta hepática frente ao estresse térmico, os dados indicam que o SNS exerce um controle tônico estimulatório deste coativador transcricional, em situações basais e de demanda como o frio*. Essa possível regulação hepática de Ser²⁷³ CRTC-3 pelo SNS está de acordo com o trabalho de Song et al. (2010) que demonstraram que a ativação β adrenérgica no tecido adiposo promove ativação de CRTC-3, via cascata do AMPc.

Em conjunto, o presente trabalho é o primeiro a fornecer evidências acerca do papel modulatório do SNS na atividade dos membros da família dos CRTCs (Ser²⁷⁵ CRTC-2 e Ser²⁷³ CRTC-3) no fígado de camundongos expostos a baixas temperaturas. Apesar dos CRTCs não serem fundamentais para CREB transcrever seus genes alvos, sua presença no complexo nuclear aumenta muito a atividade desse fator transcricional (ALTAREJOS; MONTMINY, 2011). Portanto, futuros estudos devem investigar se esses coativadores estão ou não envolvidos na ativação da neoglicogênese desencadeada pelo SNS, durante o estresse térmico.

Os resultados relacionados ao estado de fosforilação dos resíduos do CRTC-2 nos fornecem evidências importantes acerca das possíveis vias de sinalização pelas quais a noradrenalina estaria ativando a maquinaria neoglicogênica. O fígado possui 3 receptores

adrenérgicos que desencadeiam diferentes transduções de sinais capazes de ativar a neoglicogênese: os AR β_2 , que levam à ativação do AMPc, os AR α_1 , os quais estão associados às vias mobilizadoras de Ca^{2+} intracelular e os α_2 , que poderiam levar à sinalização de JNK (GOLDSTEIN; HAGER, 2018; ROSSI et al., 2018).

A via canônica do AMPc foi investigada por meio do estado de fosforilação de substratos de PKA, como indicativo da atividade dessa quinase, bem como por resíduos específicos da LKB1 e das HDACs de classe II. Os dados do estado de fosforilação dessas proteínas indicam que a via AMPc/PKA está ativa em fígado de animais inervados, em resposta ao estresse térmico. De forma concordante, Habara (1989) demonstrou que, em ratos aclimatados ao frio, ocorre aumento do AMPc hepático. Entretanto, o presente estudo mostra que não houve modulação dessa via pelo componente simpático. Apesar da fosforilação da HDAC7 ser modulada pela simpatectomia no frio, não se pode concluir de forma definitiva que o SNS foi capaz de modular a via AMPc/PKA, uma vez que foi a única alteração encontrada dentre vários parâmetros avaliados.

Apesar dos dados indicarem que *a via do AMPc/PKA não participa da resposta da neoglicogênese mediada pelo simpático*, é importante lembrar que essa mesma via é a responsável pelos efeitos gênicos hepáticos do glucagon, cuja concentração plasmática está aumentada em resposta ao frio, tanto em animais inervados como nos simpatectomizados. Esses resultados estão de acordo com o estado de fosforilação do *Ser¹⁷¹ CRTC-2*, discutidos anteriormente, e reforçam a ideia de que o estresse térmico, independentemente da ativação simpática, aumentou a secreção do glucagon e este hormônio levou à ativação hepática da via de sinalização da PKA que, por sua vez, inibiu SIK e facilitou a defosforilação e ativação do CRTC-2 e, possivelmente, também de CREB (ver figura 11). A possibilidade do glucagon ter ativado CREB, tanto nos animais inervados como nos simpatectomizados, poderia explicar porque a simpatectomia não aboliu completamente a atividade transcricional de CREB avaliada nos animais CRE-luc.

Para investigar a participação de vias de sinalização associadas ao Ca^{2+} , avaliou-se, inicialmente, os substratos de PKC, uma proteína que é ativada pelo aumento intracelular desse segundo mensageiro. Os dados mostram que esses substratos foram bastante fosforilados em resposta ao frio indicando maior atividade desta quinase, a qual também foi modulada pelo simpático, uma vez que este efeito é bloqueado em fígado de animais simpatectomizados. A ativação da PKC pela noradrenalina é provavelmente um efeito decorrente do aumento do conteúdo citosólico de Ca^{2+} promovido pelo acoplamento desse neurotransmissor aos ARs α_1 e à consequente ativação da Fosfolipase C. Há evidências farmacológicas de que esta ação

adrenérgica leva à ativação da neoglicogênese. Taylor, Reinhart e Bygrave (1983) demonstraram que a estimulação do receptor $\alpha 1$ por diferentes agonistas aumentava o influxo de Ca^{2+} e o fluxo da neoglicogênese em fígado de ratos. Em seguida, Shiota, Tanaka e Sugano (1985) demonstraram que a perfusão de fígado de ratos aclimatados ao frio com noradrenalina e fenilefrina (agonista $\alpha 1$) aumentou a neoglicogênese, sendo essa resposta reduzida em meio sem Ca^{2+} ou com fentolamina (antagonista α não seletivo). Eles ainda observaram que a estimulação com glucagon não foi capaz de aumentar a neoglicogênese, após 5 e 10 dias de exposição de frio. Chu et al. (2000) também observaram que a administração exógena de noradrenalina em cães ativava a neoglicogênese hepática e que este efeito era inibido por antagonistas dos ARs α e $\alpha 1$. Apesar de todas essas evidências, os mecanismos moleculares envolvidos na ativação da neoglicogênese pela ativação simpática dos AR $\alpha 1$ ainda permanecem desconhecidos.

Para avançar nessa questão, avaliou-se no presente estudo o estado de fosforilação da CaMKII, uma proteína que sabidamente fosforila e ativa CREB em situações de mobilização intracelular de Ca^{2+} . Nossos dados mostram que o estresse térmico foi capaz de estimular tanto a fosforilação de CaMKII assim como as HDACs de classe II em resíduos fosforilados por esta quinase, sendo todos esses efeitos abolidos pela simpatectomia.

Com base nesses resultados, *é possível sugerir que a noradrenalina liberada pelos nervos simpáticos, em resposta ao frio, atue predominantemente via AR $\alpha 1$ levando ao aumento no conteúdo citosólico de Ca^{2+} . Por sua vez, o Ca^{2+} pode ativar a CaMKII e com isso promover a fosforilação de CREB (HAUS-SEUFFERT; MEISTERERENST, 2000) e dar assim início à expressão de genes relacionados à neoglicogênese. Essa atividade transcricional seria amplificada pelo recrutamento nuclear do Ser^{275} CRTK-2 (ver figura 13 e 17).*

Embora se saiba que a noradrenalina possui maior afinidade aos AR $\alpha 1$ quando comparados aos $\beta 2$ (ZAIA, 2009), é possível que ela também ative os ARs $\alpha 2$. Em um estudo recente, Rossi et al. (2018) demonstraram que os ARs $\alpha 2$ hepáticos podem ativar a neoglicogênese por uma via independente de AMPc e Ca^{2+} , provavelmente envolvendo a ativação de JNK. Portanto, para averiguar indiretamente se os efeitos do estresse térmico na produção de glicose hepática “de novo” envolveriam a participação do AR $\alpha 2$ foi avaliado o estado de fosforilação de JNK. Apesar dos dados mostrarem que a exposição ao frio, por 3 horas, ativa essa quinase, não ocorreu modulação da mesma pela simpatectomia, sugerindo assim que *a hiperglicemia causada pela ativação simpática induzida pela exposição ao frio não envolve a participação dos ARs $\alpha 2$.*

Um dos objetivos desse estudo foi também investigar o mecanismo clássico de regulação do programa da neoglicogênese que ocorre pelo fator transcricional FoxO. Diferentemente de CREB, FoxO possui diversos tipos de regulações covalentes (diferentes sítios de fosforilação e acetilação) que determinam a sua translocação entre o núcleo e o citoplasma.

A AKT é uma enzima chave na ação da insulina que é responsável pela inibição de FoxO1/3 por meio de mecanismos de fosforilação. Nossos dados mostram que a ativação de AKT foi reduzida pelo estresse térmico, como é possível observar pela redução da sua fosforilação no fígado dos animais inervados e simpatectomizados. Resultados semelhantes foram relatados por Sepa-Kishi et al. (2018), em resposta ao estresse crônico em ratos, onde observaram redução da sinalização de AKT e consequente aumento da expressão de FoxO1. A inativação da AKT foi provavelmente resultante da redução da insulinemia e, sem dúvida, contribuiu para a defosforilação e consequente ativação de FoxO1/3, um efeito que também não foi modulado pelo simpático. É possível observar que além de FoxO1 estar menos fosforilado no frio, o modelo de estresse térmico foi capaz de aumentar o conteúdo total dessa proteína. Resultados semelhantes foram relatados por Sepa-Kishi et al. (2018) em situação de estresse crônico. Além da baixa insulinemia é possível que as altas concentrações de corticosterona tenham levado à maior ativação de FoxO, uma vez que se sabe que este hormônio interfere negativamente na sinalização e fosforilação da AKT e aumenta diretamente a expressão e atividade nuclear de FoxO (KUO et al., 2015). O aumento do conteúdo hepático de FoxO1 em resposta ao frio pode ser fisiologicamente importante não apenas para a ativação da neoglicogênese, mas também para adaptações ao estresse térmico relacionadas ao metabolismo hepático de lipídios e proteínas (LEE; DONG, 2017).

Além do clássico controle inibitório de AKT sobre FoxO, Ozcon et al. (2012) demonstraram que a via de Ca^{2+} , por meio da mobilização de CaMKII, e consequente fosforilação e ativação de P38 consegue ativar FoxO1 e aumentar a neoglicogênese, em resposta ao glucagon. Entretanto, a análise dos dados de animais inervados sob estresse térmico demonstra que a P38 não foi ativada em nosso modelo experimental.

Outra possibilidade de modulação de FoxO é por acetilação. Mihaylova et al. (2011) demonstraram que as HDACs deacetilam FoxO1 e com isso aumentam sua atividade transcricional. Os dados de fosforilação das HDACs nos resíduos de PKA sugerem que estas enzimas estão ativadas nos animais expostos ao frio por 6 horas o que condiz com a redução do estado de acetilação de FoxO1 encontrado no mesmo tempo. Entretanto, a simpatectomia não modulou o estado de fosforilação das HDACs e nem a acetilação de FoxO1.

Portanto, o conjunto desses dados nos permite sugerir que, *muito embora FoxO esteja sendo recrutado pelo estresse térmico por meio da redução da via de AKT, bem como por mecanismos de deacetilação, este fator transcricional não parece estar envolvido na ativação da neoglicogênese induzida pelo SNS, uma vez que a simpatectomia não foi capaz de modular o seu padrão de fosforilação ou acetilação.*

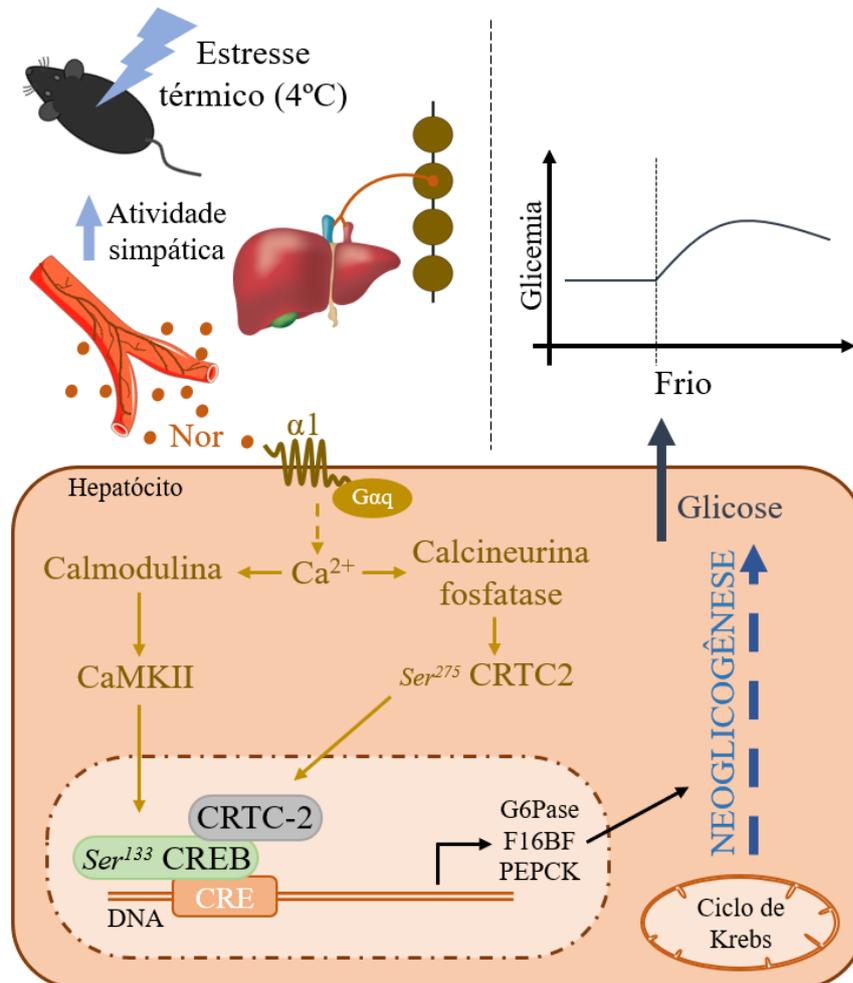


Figura 17. **Mecanismo proposto de ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática pela inervação noradrenérgica, durante o estresse térmico em camundongos.** Descrição da figura no texto. Seta tracejada indica relação indireta; seta contínua, relação direta. Fonte: autor.

Conclusões

6. Conclusões

Com objetivo investigar a participação de CREB/CRTC-2 na ativação da maquinaria gênica da neoglicogênese hepática induzida pela inervação noradrenérgica, durante o estresse térmico agudo (4°C), experimentos foram conduzidos em camundongos inervados e simpatectomizados. Os resultados mostraram que:

1. a arquitetura da inervação noradrenérgica em fígado de camundongos é restrita à vasculatura desse tecido, formando uma espécie de rede/teia ao redor dos vasos;
2. a exposição ao frio ativa a inervação noradrenérgica hepática e promove aumento da glicemia, muito provavelmente decorrente da estimulação do programa gênico da neoglicogênese;
3. a atividade transcricional de CREB é estimulada pela inervação noradrenérgica hepática, durante o estresse térmico;
4. a ativação de CREB pelo SNS é provavelmente mediado pela CaMKII, uma enzima que é ativada em resposta ao aumento do Ca^{2+} intracelular provocado pela estimulação dos ARs $\alpha 1$, durante o estresse térmico;
5. a inervação noradrenérgica em resposta ao frio é capaz de ativar CRTC-2 por meio da desfosforilação do resíduo de *Ser*²⁷⁵, um resíduo modulado preferencialmente pela calcineurina fosfatase.
6. embora FoxO seja ativado no fígado de camundongos expostos ao frio, ele não parece participar da ativação gênica da neoglicogênese induzida pela inervação noradrenérgica.

Referências

- AKIYOSHI, H.; GONDA, T.; TERADA, T. A comparative histochemical and immunohistochemical study of aminergic, cholinergic and peptidergic innervation in rat, hamster, guinea pig, dog and human livers. **Liver**, v. 18, n. 5, p. 352–359, 1998.
- 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.
- BARCROFT, J. “La fixité du milieu intérieur est la condition de la vie libre.” (Claude Bernard). **Biological Reviews**, v. 7, n. 1, p. 24–87, 1 jan. 1932.
- BARNETT, S. A. ADAPTATION OF MICE TO COLD. **Biological Reviews**, v. 40, n. 1, p. 5–51, 1 fev. 1965.
- BERNARD, C., Chiens rendus diabetiques. **CR Soc Biol**, p. 506-520, 1849.
- BLUM, D. et al. **Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson’s disease** *Progress in Neurobiology* Pergamon, , 1 out. 2001.
- BRITO, N. A. et al. 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.
- CHIDA, Y. et al. The hepatic sympathetic nerve plays a critical role in preventing Fas induced liver injury in mice. **Gut**, v. 54, n. 7, p. 994–1002, 2005.
- CHU, C. A et al. The direct effects of catecholamines on hepatic glucose production occur via alpha(1)- and beta(2)-receptors in the dog. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 279, n. 2, p. E463–E473, 2000.
- DE VADDER, F. et al. Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 151–157, 12 jul. 2016.
- DEFRONZO, R. A. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 773–95, 1 abr. 2009.
- DELFINO, H. B. P. **Regulação simpática de genes e enzimas chaves da neoglicogênese em fígado de roedores expostos ao frio**. 2018. 113f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.
- EDWARDS, C. I. W.; HOWLAND, R. J. Adaptive changes in insulin and glucagon secretion

- during cold acclimation in the rat. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 250, n. 6 (13/6), 1986.
- EISENBERG, R. M.; SORRENTINO, JR., S.; KNIGGE, K. M. Effects of Cold Exposure on Plasma Growth Hormone in the Adrenalectomized and Thyroparathyroidectomized Rat. **Neuroendocrinology**, v. 9, n. 1, p. 58–63, 1972.
- ERION, D. M. et al. Prevention of Hepatic Steatosis and Hepatic Insulin Resistance by Knockdown of cAMP Response Element-Binding Protein. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 6, p. 499–506, 2009.
- EXTON, J. H. Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 248, n. 6, p. E633–E647, jun. 1985.
- GARCEAU, D.; YAMAGUCHI, N.; GOYER, R. Hepatic adrenoceptors involved in the glycogenolytic response to exogenous (-)-norepinephrine in the dog liver in vivo. **Life Sciences**, v. 37, n. 21, p. 1963–1970, 25 nov. 1985.
- GAROFALO, M. A. R. et al. Effect of acute cold exposure on norpinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 60, n. 3, p. 206–208, 12 set. 1996.
- GERICH, J. E. et al. Renal gluconeogenesis. **Diabetes Care**, v. 24, n. 2, p. 382–391, 2001.
- GILBEY, M. P.; MICHAEL SPYER, K. Essential organization of the sympathetic nervous system. **Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 7, n. 2, p. 259–278, 1993.
- GOLDSTEIN, I.; HAGER, G. L. The three ds of transcription activation by glucagon: Direct, delayed, and dynamic. **Endocrinology**, v. 159, n. 1, p. 206–216, 2018.
- HABARA, Y. Effects of cold exposure on cyclic AMP concentration in plasma, liver, and brown and white adipose tissues in cold-acclimated rats. **International Journal of Biometeorology**, v. 33, n. 2, p. 95–100, 1989.
- HADDAD-JUNIOR, H. Uma Breve História da Fisiologia. In: Aires, M. M. **Fisiologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 2-27. ISBN 978-85-277-2100-4.
- 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.
- HERZIG, S. et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 179–183, 2001.
- HILL, M. J. et al. CRT2 Is a Coactivator of GR and Couples GR and CREB in the

- Regulation of Hepatic Gluconeogenesis. **Molecular Endocrinology**, v. 30, n. 1, p. 104–117, 2016.
- JARHULT, J. et al. The functional importance of sympathetic nerves to the liver and endocrine pancreas. **Annals of Surgery**, v. 189, n. 1, p. 96–100, 1979.
- JÄRHULT, J. et al. 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, 1 set. 1980.
- JENSEN, K. J.; ALPINI, G.; GLASER, S. Hepatic nervous system and neurobiology of the liver. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 655–666, 2013.
- JONSSON, G. Chemical Neurotoxins as Denervation Tools in Neurobiology. **Annual Review of Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 169–187, 28 mar. 1980.
- KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–846, 14 dez. 2006.
- KANT, G. J. et al. Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP, and plasma prolactin, corticosterone and growth hormone in male rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 18, n. 6, p. 967–971, 1 jan. 1983.
- KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C.; MIGLIORINI, R. H. Controle Hormonal e Neural do Metabolismo Energético. In: Aires, M. M. **Fisiologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. Cap. 74, p. 1167-1179. ISBN 978-85-277-2100-4.
- KIM, Y. D. et al. Orphan nuclear receptor small heterodimer partner negatively regulates growth hormone-mediated induction of hepatic gluconeogenesis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) transactivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 44, p. 37098–37108, 26 out. 2012.
- KINOTE, A. et al. Fructose-Induced Hypothalamic AMPK Activation Stimulates Hepatic PEPCK and Gluconeogenesis due to Increased Corticosterone Levels. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3633–3645, 1 ago. 2012.
- KOO, S.-H. et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. **Nature**, v. 437, n. 7062, p. 1109–1114, 7 out. 2005.
- 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, 1 nov. 1990.
- KUO, T. et al. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. In: WANG, J.-C.; HARRIS, C. (Eds.). . **Glucocorticoid Signaling**. New York: Springer, New York, NY,

2015. p. 99–126.
- 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, 1 nov. 1984.
- LAUTT, W. W.; WONG, C. Hepatic parasympathetic neural effect on glucose balance in the intact liver. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 4, p. 679–682, 1 ago. 1978.
- LEE, S.; DONG, H. H. **FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism** *Journal of Endocrinology* BioScientifica Ltd., , 1 maio 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35480241/>?report=abstract. Acesso em: 16 dez. 2020
- LI, B. et al. Microbiota Depletion Impairs Thermogenesis of Brown Adipose Tissue and Browning of White Adipose Tissue. **Cell Reports**, v. 26, n. 10, p. 2720- 2737.e5, 5 mar. 2019.
- LIU, Y. et al. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 269–273, 2008.
- LUO, Q. et al. Mechanism of CREB recognition and coactivation by the CREB-regulated transcriptional coactivator CRTC2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 51, p. 20865–20870, 18 dez. 2012.
- MATSUHISA, M. et al. Important role of the hepatic vagus nerve in glucose uptake and production by the liver. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 1, p. 11–16, 1 jan. 2000.
- MATSUMOTO, M. et al. Impaired Regulation of Hepatic Glucose Production in Mice Lacking the Forkhead Transcription Factor Foxo1 in Liver. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 3, p. 208–216, 5 set. 2007.
- MAYR, B.; MONTMINY, M. R. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 8, p. 599–609, 2001.
- MCMILLIAN, M. K.; SCHANBERG, S. M.; KUHN, C. M. Ontogeny of rat hepatic adrenoceptors. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 227, n. 1, p. 181–6, 1 out. 1983.
- MICHAEL, M. D. et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. **Molecular Cell**, v. 6, n. 1, p. 87–97, 1 jul. 2000.

- MIGLIORINI, R. H. et al. Rapid activation of gluconeogenesis after intracerebroventricular carbachol. **The American journal of physiology**, v. 257, n. 4 Pt 1, p. E486-90, 1989.
- MIHAYLOVA, M. M. et al. Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. **Cell**, v. 145, n. 4, p. 607–621, 2011.
- MIZUNO, K.; UENO, Y. Autonomic Nervous System and the Liver. **Hepatology Research**, v. 47, n. 2, p. 160–165, 2017.
- MONTMINY, M. R.; BILEZIKJIAN, L. M. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. **Nature**, v. 328, n. 6126, p. 175–178, 1987.
- MORGAN, N. G. et al. Stimulation of hepatic glycogenolysis by alpha1 and beta2 adrenergic agonists. **The journal of biological chemistry**, v. 257, n. December 10, p. 13907–13910, 1982.
- MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J.; TUPONE, D. **Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure** *Cell Metabolism* Cell Press, , 6 maio 2014.
- MORTON, G. J. et al. Evidence that the sympathetic nervous system elicits rapid, coordinated, and reciprocal adjustments of insulin secretion and insulin sensitivity during cold exposure. **Diabetes**, v. 66, n. 4, p. 823–834, 1 abr. 2017.
- NAVEGANTES, L. C. C. **Controle do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de rato pelo sistema nervoso simpático**. 1998. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Glicólise, Gliconeogênese e a Via das Pentoses-Fosfato. In: _____. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Cap. 14, p. 543-586. ISBN 978-85-8271-073-9.
- O-SULLIVAN, I. et al. FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization. **Nature Communications**, v. 6, n. May, p. 1–12, 2015.
- OOMURA, Y.; YOSHIMATSU, H. Neural network of glucose monitoring system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 10, n. 3–4, p. 359–372, 1 maio 1984.
- OYADOMARI, S. et al. Dephosphorylation of Translation Initiation Factor 2 α Enhances Glucose Tolerance and Attenuates Hepatosteatosis in Mice. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 6, p. 520–532, 4 jun. 2008.
- OZCAN, L. et al. Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in

- fasting and obesity. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 739–751, 2012.
- PATEL, K. et al. The LKB1-salt-inducible kinase pathway functions as a key gluconeogenic suppressor in the liver. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–16, 2014.
- RAVNSKJAER, K. et al. Cooperative interactions between CBP and TORC2 confer selectivity to CREB target gene expression. **EMBO Journal**, v. 26, n. 12, p. 2880–2889, 2007.
- RAVNSKJAER, K. et al. Glucagon regulates gluconeogenesis through KAT2B- and WDR5-mediated epigenetic effects. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 10, p. 4318–4328, 1 out. 2013.
- RODRIGUEZ-DIAZ, R. et al. Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 45–54, 6 jul. 2011.
- ROSSI, M. et al. Hepatic Gi signaling regulates whole-body glucose homeostasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 2, p. 746–759, 16 jan. 2018.
- RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 1, p. 177–197, 2017.
- SACCA, L. et al. Role of gluconeogenesis in epinephrine-stimulated hepatic glucose production in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 245, n. 3, p. E294–E302, set. 1983.
- SACHS, C.; JONSSON, G. DEGENERATION OF CENTRAL AND PERIPHERAL NORADRENALINE NEURONS PRODUCED BY 6-HYDROXY-DOPA. **Journal of Neurochemistry**, v. 19, n. 6, p. 1561–1575, 1 jun. 1972.
- SÄNGER, C. et al. Intrahepatic vascular anatomy in rats and mice - Variations and surgical implications. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–13, 2015.
- SCHMELCK, P. H.; HANOUNE, J. The hepatic adrenergic receptors. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 33, n. 1–2, p. 35–48, 1980.
- SCREATON, R. A. et al. The CREB Coactivator TORC2 Functions as a Calcium-and cAMP-Sensitive Coincidence Detector. **Cell**, v. 119, p. 61–74, 2004.
- SEGSTRO, R.; GREENWAY, C. Alpha adrenoceptor subtype mediating sympathetic mobilization of blood from the hepatic venous system in anesthetized cats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 236, n. 1, 1986.
- SEPA-KISHI, D. M. et al. Cold acclimation reduces hepatic protein Kinase B and AMP-activated protein kinase phosphorylation and increases gluconeogenesis in rats. **Physiological Reports**, v. 6, n. 5, p. 1–12, 2018.

- SHIMAZU, T.; FUKUDA, A. Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. **Science**, v. 150, n. 3703, p. 1607–1608, 17 dez. 1965.
- SHIOTA, M.; TANAKA, T.; SUGANO, T. Effect of norepinephrine on gluconeogenesis in perfused livers of cold-exposed rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 12, n. 3, 1985.
- SONG, Y. et al. CRT3 links catecholamine signalling to energy balance. **Nature**, v. 468, n. 7326, p. 933–939, 16 dez. 2010.
- TAG, C. G. et al. Bile duct ligation in mice: Induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, p. 1–11, 2015.
- TAYLOR, W. M.; REINHART, P. H.; BYGRAVE, F. L. Stimulation by alpha-adrenergic agonists of Ca²⁺ fluxes, mitochondrial oxidation and gluconeogenesis in perfused rat liver. **The Biochemical journal**, v. 212, n. 3, p. 555–65, 15 jun. 1983.
- TORRES, S. J.; NOWSON, C. A. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. **Nutrition**, v. 23, n. 11–12, p. 887–894, 2007.
- TRIVIÑO, T.; ABIB, S. DE C. V. Anatomia cirúrgica do fígado. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 5, p. 407–414, out. 2003.
- ULRICH-LAI, Y. M.; ARNHOLD, M. M.; ENGELAND, W. C. Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 4, p. 1128–1135, abr. 2006.
- VESCOVI, P. P. et al. Plasma ACTH, beta-endorphin, prolactin, growth hormone and luteinizing hormone levels after thermal stress, heat and cold. **Stress Medicine**, v. 8, n. 3, p. 187–191, 1 jul. 1992.
- WALKER, J. M.; WATERBORG, J. H.; MATTHEWS, H. R. The Lowry Method for Protein Quantitation. In: **Basic Protein and Peptide Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2003. p. 1–4.
- WANG, Y. et al. Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic gluconeogenesis in fasting and diabetes. **Nature**, v. 485, n. 7396, p. 128–132, 2012.
- WINKLER, R. et al. Histone deacetylase 6 (HDAC6) is an essential modifier of glucocorticoid-induced hepatic gluconeogenesis. **Diabetes**, v. 61, n. 2, p. 513–523, 1 fev. 2012.

- ZAIA, C. T. B. V. Sistema nervoso autônomo ou neurovegetativo e seu controle central. In: Curi, R; Procopio, J. **Fisiologia básica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 19, p. 309-327. ISBN 978-85-277-1559-1.
- ZHANG, K. et al. Hepatic Suppression of *Foxo1* and *Foxo3* Causes Hypoglycemia and Hyperlipidemia in Mice. **Endocrinology**, v. 153, n. 2, p. 631–646, 1 fev. 2012.