

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

Felipe Garcia da Silva Sucupira

**Impacto do receptor de estrogênio alfa na doença hepática gordurosa não
alcoólica e metabolismo energético do fígado**

VERSÃO ORIGINAL

RIBEIRÃO PRETO
2023

Felipe Garcia da Silva Sucupira

Impacto do Receptor de Estrogênio Alfa na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Metabolismo Energético do Fígado

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

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Gabriel Camporez

VERSÃO ORIGINAL

RIBEIRÃO PRETO
2023

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sucupira, Felipe Garcia da Silva

Impacto do Receptor de Estrogênio Alfa na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Metabolismo Energético do Fígado.
49 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.
Orientador: Camporez, João Paulo Gabriel.

1.Receptor de estrogenio alfa. 2. Estradiol. 3. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.

FELIPE GARCIA DA SILVA SUCUPIRA. **Impacto do Receptor de Estrogênio Alfa na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Metabolismo Energético do Fígado.** Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado

em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Paulo Gabriel Camporez que contribuiu para realização deste trabalho, pela dedicação e empenho, por aprendizado e contribuição ao meu crescimento pessoal e acadêmico.

Agradeço a minha companheira Vanessa por estar ao meu lado em todos os momentos, por me incentivar a seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis, sempre me ajudando a atingir meu melhor

Aos meus amigos e pesquisadores do laboratório Dra. Layanne Cabral, Alessandra Cruz, Carlos Talarico, Carolina Dias.

Ao Dr. Gerald Shulman e Mario Kanh por terem me recebido e me acolhido em seu laboratório, me proporcionando uma das melhores experiências de aprendizado que tive em minha vida.

A todos os meus amigos que durante meu mestrado me apoiaram para sempre. Fernando Santa Rosa, Gabriel Werneck, Pedro Caliman, Pedro Pessota e toda a Guilda, por terem me apoiado por todos esses anos.

Agradeço ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pela abertura e viabilidade deste projeto.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio recebido, viabilizando a realização deste trabalho através da bolsa de Mestrado processo 2021/02638-9, bem como o respeito que eles demonstram em relação ao pesquisador.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution”
- Theodosius Dobzhansky

Lista de Figuras

Figura 1: Comparação de massa inicial e final.

Figura 2: Comparação de ganho de massa.

Figura 3: Teste de tolerância a glicose, fêmeas.

Figura 4: Teste de tolerância a glicose, machos.

Figura 5: Conteúdo hepático de triglicerídeos.

Figura 6: Conteúdo plasmático de triglicerídeos.

Figura 7: Teste de exportação de lipídeos, fêmeas.

Figura 8: Teste de exportação de lipídeos, machos.

Figura 9: Quantificação de diferentes espécies lipídicas, fêmeas.

Figura 10: Quantificação de diferentes espécies lipídicas, machos.

Figura 11: Expressão genica relativa, machos.

Figura 12: Expressão genica relativa, fêmeas.

Figura 13: Expressão proteica.

Figura 14: Teste de tolerância a glicose, 8 semanas, fêmeas.

Figura 15: Teste de tolerância a glicose, 8 semanas, machos.

Figura 16: Clamp euglicemico-hiperinsulinemico.

Figura 17: Avaliação da fosforilação de AKT no fígado

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC,	Área sob a curva
ACC,	Acetil-CoA-carboxilase
AKT,	Proteína quinase B
CHC,	Carcinoma hepatocelular
DAG,	Diacilglicerídeos
DHGNA,	Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica
DM2,	Diabetes mellitus do tipo 2
ER α ,	Receptor de estradiol α
E2,	Estradiol
FASN,	Enzima de ácido graxo sintase
GTT,	Teste de tolerância à glicose
HDL,	Lipoproteína de alta densidade
HFD,	Dieta hipelipídica
i.p.,	Injeção intraperitoneal
IL,	Interleucina
IRS-1,	Receptor de insulina do tipo 1
L-ER α KO,	Liver estrogen receptor alfa knockout
NAFLD,	Non-alcoholic fatty liver disease - Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica
OVX,	Ovariectomia
PCR,	Reação em cadeia da polimerase
PEPCK,	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PKC,	Proteína kinase C
SREBP1c,	Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol-1c
TAG,	Triacilglicerídeos
TNF α ,	Fator de necrose tumoral alfa

FELIPE GARCIA DA SILVA SUCUPIRA. **Impacto do Receptor de Estrogênio Alfa na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Metabolismo Energético do Fígado**. 2023, 49p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Resumo

O estilo de vida e o aumento do consumo de dieta rica em gorduras contribuem amplamente para o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares. Uma das consequências desse estilo de vida e dieta rica em gorduras é a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA), que afeta cerca de 30% dos adultos e até 10% das crianças em países desenvolvidos. Doenças cardiovasculares associadas a complicações metabólicas, como resistência à insulina e obesidade, são menos frequentes em mulheres jovens do que em homens na mesma idade ou em mulheres após a menopausa. Mulheres após a menopausa, possuem um risco maior de intolerância a glicose, resistência à insulina, hiperlipemia e acúmulo de gordura visceral. Diversos mecanismos são atualmente considerados como causadores da resistência à insulina, como metabolismo anormal de lipídios e seu acúmulo ectópico, disfunção mitocondrial, inflamação e estresse de retículo endoplasmático. Nas últimas décadas, dados provenientes de estudos clínicos e experimentais revelaram que o estradiol contribui enormemente para a homeostase glicêmica. De fato, a redução da concentração de estrogênio durante a menopausa está associada com o aumento de gordura visceral e, por sua vez, doenças metabólicas como resistência à insulina, DM2 e doenças cardiovasculares. Também foi relatado que mulheres com síndrome de Turner, sem produção endógena de estrogênio, possuem um maior risco de desenvolverem DHGNA do que mulheres não portadoras da síndrome. Além disso, estudos recentes mostraram que o grau de fibrose hepática e/ou a taxa de progressão para carcinoma hepatocelular (CHC) em pacientes com DHGNA é maior em mulheres na pós-menopausa e homens do que em mulheres pré-menopausa. Esses achados sugerem que a disparidade de gênero na DHGNA provavelmente está relacionada a diferenças nos hormônios sexuais, tornando as mulheres mais resistentes à progressão da DHGNA do que os homens. Porém, permanecendo desconhecido como o estradiol está relacionado ao desenvolvimento e progressão da DHGNA. Sendo o fígado um órgão central no desenvolvimento do DM2, o objetivo geral desse projeto é estudar (*in vivo*) os efeitos causados pela ausência do receptor de estrogênio alfa (ER α) sobre o metabolismo energético hepático utilizando animais com deleção do ER α especificamente no fígado (sistema Cre-Lox). Podemos observar que a ausência do ER α promoveu mudanças significativas quanto a tolerância a glicose onde os animais knockout para o receptor se tornaram cerca de 15% menos tolerantes a variações de glicose, maior acúmulo de triglicérides hepáticos, e alterações significativas nas vias de gliconeogênese.

Palavras-chave: Receptor de estrogênio alfa; Estradiol; Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

FELIPE GARCIA DA SILVA SUCUPIRA. **Impact of Estrogen Receptor Alpha on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Liver Energy Metabolism.** 2023, 49p. Dissertation (Masters) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Abstract

Lifestyle and increased consumption of high-fat diet largely contribute to the development of obesity, insulin resistance, type 2 diabetes (DM2) and cardiovascular disease. One of the consequences of this lifestyle and high-fat diet is Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), which affects about 30% of adults and up to 10% of children in developed countries. Cardiovascular diseases associated with metabolic complications, such as insulin resistance and obesity, are less frequent in young women than in men of the same age or in women after menopause. Women after menopause have a higher risk of glucose intolerance, insulin resistance, hyperlipemia and visceral fat accumulation. Several mechanisms are currently considered to cause insulin resistance, such as abnormal lipid metabolism and ectopic accumulation, mitochondrial dysfunction, inflammation and endoplasmic reticulum stress. In recent decades, data from clinical and experimental studies have revealed that estradiol contributes enormously to glycemic homeostasis. Indeed, reduced estrogen levels during menopause are associated with increased visceral fat and, in turn, metabolic diseases such as insulin resistance, T2DM, and cardiovascular disease. It has also been reported that women with Turner syndrome, without endogenous estrogen production, have a higher risk of developing NAFLD than women without the syndrome. Furthermore, recent studies have shown that the degree of liver fibrosis and/or the rate of progression to hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with NAFLD is higher in postmenopausal women and men than in premenopausal women. These findings suggest that gender disparity in NAFLD is likely related to differences in sex hormones, making women more resistant to NAFLD progression than men. However, it remains unknown how estradiol is related to the development and progression of NAFLD. Since the liver is a central organ in the development of T2DM, the general objective of this project is to study (in vivo) the effects caused by the absence of estrogen receptor alpha (ER α) on hepatic energy metabolism using animals with ER α deletion specifically in the liver (Cre-Lox system). We can see that the absence of ER α promoted significant changes in glucose tolerance where the receptor knockout animals became about 15% less tolerant to glucose variations, greater accumulation of hepatic triglycerides, and significant changes in gluconeogenesis pathways.

Keywords: Estrogen receptor alfa; Estradiol; Non-alcoholic fatty liver disease

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	pg. 12
2.	OBJETIVOS	pg. 20
3.	MÉTODOS	pg. 21
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	pg. 27
5.	CONCLUSÃO	pg. 44
6.	REFERENCIAS	pg. 45

1. Introdução

1.1 Doença hepática gordurosa não alcoólica

Uma das consequências do estilo de vida ocidental e dieta rica em gorduras é a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA), que afeta cerca de 30% dos adultos e até 10% das crianças em países desenvolvidos (Cohen et al., 2011). Além disso, é estimado que as regiões com maior prevalência da doença sejam Oriente médio, América do sul e sul do continente africano (Younossi, Z. 2016). Sendo que a causa mais comum atribuída ao desenvolvimento da doença nesses países é o alto consumo calórico (Fabbrini E. 2010).

O desenvolvimento da DHGNA começa com o acúmulo de triglicerídeos (TAG) no fígado e é definida como a presença de gotículas de lipídeos presentes no citoplasma de mais de 5% dos hepatócitos (Birkenfeld and Shulman, 2014). Essa doença se desenvolve quando o ritmo de síntese hepática de TAG, como resultado do aumento da captação de ácidos graxos e sua esterificação em TAG assim como da lipogênese de novo a partir do metabolismo de carboidratos e proteínas, excede o ritmo de catabolismo do TAG hepático por meio da oxidação de ácidos graxos ou a secreção de TAG em forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Birkenfeld and Shulman, 2014).

Uma das grandes preocupações com a DHGNA é que o acúmulo de lipídeos hepáticos tem sido claramente ligado ao desenvolvimento de resistência hepática à insulina e DM2. Além disso, sendo possível a progressão da doença para outras formas como esteatohepatite, cirrose e hepatocarcinoma (Cohen, JC. 2011). O aumento da prevalência de DHGNA foi associado com valores de índice de massa corpórea aumentados (Ruhl CE, 2003). Porém, foi sugerido que a população asiática pode ter o desenvolvimento da DHGNA mesmo com baixos índices de massa corpórea, sendo uma associação importante para a delimitação de limiares para determinação de obesidade nessa população (Misra, A. et al. 2009).

Devido a sua crescente incidência e sua possível progressão para esteatohepatite não alcoólica, o interesse no estudo da DHGNA é cada vez maior. O diagnóstico da DHGNA geralmente é feito por meio de dosagem de aminotransferases, que quando elevadas podem ser um indicativo da doença e diagnóstico por imagem, para detecção de acúmulo de gordura no tecido hepático. A presença da DHGNA e sua forma e sua forma progressiva como esteatohepatite estão altamente correlacionadas com a síndrome metabólica, que pode incluir um

ou mais dos seguintes fatores: obesidade, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão arterial (Huang, P. 2009).

Pacientes diagnosticados com DHGNA possuem um risco até duas vezes maior de ir a óbito devido a doenças cardiovasculares, que altamente se relacionam e dividem fatores de risco com outras comorbidades que fazem parte da síndrome metabólica como obesidade e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) (Lindenmeyer, C. 2018). Pessoas diagnosticadas com a DHGNA podem ter o risco de desenvolvimento de DM2 aumentado em até duas vezes (Ballestri, S. et al. 2016). Sendo que há muitos anos a DM2 já é reconhecida como parte da patologia da DHGNA (Choudhury, J. & Sanyal, A. J. 2004).

Foi sugerido que a presença de mutações no gene PNPLA3, podem causar diferenças na suscetibilidade entre diferentes etnias, como latinos, caucasianos e afro-americanos (Romeo, S. et al. 2008). Foi sugerido também que dentre as populações do oeste asiático, a presença do gene que codifica a proteína apolipoproteína C-3 (APOC3), estaria associada a um aumento significativo no risco de desenvolvimento da DHGNA (Petersen, K. F. 2010).

Outra fonte de ácidos graxos é a lipogênese de novo, onde novos ácidos graxos são formados a partir de glicose e frutose. Estudos com isótopos estáveis demonstraram que a lipogênese *de novo* possui papel essencial no desenvolvimento da DHGNA (Donnelly, K. L. 2005). O consumo de bebidas açucaradas que podem conter sacarose ou uma mistura de frutose e glicose foram associadas ao acúmulo hepático de gordura e desenvolvimento da esteatohepatite (Schwarz, J. M. 2017; Sofic, S., Cohen, D. E. & Kahn, C. R. 2016). Foi sugerido que o acúmulo tecidual de TAG possa ter surgido de um mecanismo adaptativo que visa o armazenamento de ácidos graxos, quando o aporte de ácidos graxos ultrapassa a capacidade de metabolização deles (Samuel, V. T. & Shulman, G. I. 2016; Yki-Järvinen, H 2014).

Problemas na cadeia fosforilativa promovida pela sinalização da insulina no tecido adiposo é uma das causas do desenvolvimento da DHGNA e da esteatohepatite, já que defeitos na via de sinalização de insulina neste tecido podem alterar os processos de lipólise, fazendo com que haja um transporte excessivo de ácidos graxos para o fígado (Lomonaco, R. 2012).

A resistência à insulina é uma das características comuns presentes na DHGNA (Loomba, R. 2012). A resistência a insulina pode afetar diversos tecidos, tendo como principais tecidos metabolicamente ativos o fígado, tecido adiposo e tecido muscular esquelético. Diversos estudos já demonstram a comunicação entre o tecido adiposo e o fígado, diversos peptídeos como adiponectina, interleucina 6 e outros podem ter papéis protetores ou pró-inflamatórios no fígado (Sabio, G. 2008; Tilg, H. 2010).

Diversos modelos de estudo são atualmente utilizados para permitir o melhor entendimento sobre vários aspectos da DHGNA, esses modelos vão desde cultura celular até modelos animais. Diversas vias são alvo de estudo, como por exemplo, inflamação, estresse de retículo endoplasmático e o acúmulo de lipídeos providos da dieta e lipólise do tecido adiposo. Estudos recentes demonstram a importância de proteínas pró-inflamatórias sobre o estresse metabólico inicial e posterior morte celular, essas proteínas podem formar complexos multiproteicos presentes principalmente no citoplasma, sendo que um dos componentes necessários para a formação desses complexos são os ácidos graxos de cadeia saturada (Csak, T. 2011).

1.2 Mecanismos da Resistência à Insulina

Nos últimos 50 anos o número de pessoas diagnosticadas com diabetes mellitus tem crescido constantemente. Estimasse que até o ano de 2045 cerca de 700 milhões de pessoas serão portadores da doença. Gerando assim um custo aos sistemas de saúde de aproximadamente 850 bilhões de dólares por ano (Cho, N. H. et al. 2018). No Brasil, dados do ministério da saúde em colaboração com a Sociedade Brasileira de Diabetes indicam que cerca de 7% da população brasileira são portadoras de diabetes, cerca de 13 milhões de brasileiros, sendo que 90% dessas pessoas possuem DM2.

A DM2 é caracterizada pela resistência à insulina, onde diferentes tecidos podem ser afetados, principalmente, músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. Atualmente diversos mecanismos foram associados a resistência à insulina, como, estresse de retículo endoplasmático, inflamação e acúmulo ectópico de espécies lipídicas.

Diacilglicerol (DAG) é o penúltimo intermediário na síntese de TAG e, geralmente, corresponde com a concentração de TAG no fígado e no músculo esquelético, tanto em roedores quanto em humanos (Camporez et al., 2013; Camporez et al., 2015, Kumashiro et al., 2011). Como consequência, a associação entre DHGNA/resistência hepática à insulina e conteúdo intramiocelular de lipídios/resistência muscular à insulina foi também associada entre conteúdo de DAG no tecido e resistência à insulina. A observação direta do conteúdo de DAG no fígado associado a resistência hepática à insulina foi demonstrada tanto em roedores (Camporez et al., 2013; Camporez et al., 2015) quanto em humanos (Kumashiro et al., 2011), da mesma forma que o conteúdo de DAG no músculo associado com a resistência muscular à insulina (Camporez et al., 2017).

Como o DAG é um conhecido mediador lipídico bioativo, necessário para a ativação da proteína quinase C (PKC), foi dada atenção para um possível papel da atividade das PKCs na resistência à insulina. Com o avanço da biologia molecular e das caracterizações bioquímicas, as PKCs foram divididas em três classes: as PKCs convencionais (cPKC), que necessitam de Ca^{2+} e DAG para sua ativação; as novas PKCs (nPKC) que necessitam apenas de DAG para sua ativação; e as PKCs atípicas (aPKC) que não necessitam nem de Ca^{2+} e DAG para sua ativação. Com as características das nPKC precisando apenas de DAG para sua ativação e apresentando uma ativação lenta e sustentada, as nPKC se tornaram, aparentemente, as isoformas mais adequadas para mediar a resistência à insulina associada ao acúmulo tecidual de lipídios.

De fato, a ativação das nPKCs tem sido consistentemente observada em músculo e fígado em estado de resistência à insulina. A ativação da PKC θ associada ao acúmulo de DAG no músculo esquelético tem sido observada tanto em roedores resistentes à insulina (Camporez et al., 2013) quanto em humanos (Szendroedi et al., 2014). Esse aumento da ativação da PKC θ em músculo esquelético foi associado ao aumento da fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), consequentemente reduzindo a sinalização da insulina nesse tecido. Já no fígado, o aumento do conteúdo de DAG foi associado a ativação da isoforma PKC ϵ tanto em modelos experimentais de resistência hepática à insulina (Petersen et al., 2016; Camporez et al., 2017) quanto em humanos, que apresentam esteatose hepática e resistência à insulina (Kumashiro et al., 2011). Nos hepatócitos, a PKC ϵ fosforila o receptor de insulina (IR) em treonina, reduzindo sua capacidade de se autofosforilar em tirosina e desencadear a sinalização da insulina a jusante, levando a resistência hepática à insulina (Petersen et al., 2016).

Outra espécie de lipídios que também tem sido constantemente associada a resistência à insulina são as ceramidas. Foi observado que pacientes obesos diagnosticados com diabetes, possuem níveis mais elevados de determinadas espécies de ceramidas, quando comparados a pacientes não diagnosticados com a doença (Haus JM. 2009). As ceramidas são uma espécie de esfingolipídios que estão associados a distúrbios do metabolismo de lipídios, particularmente no fígado, inibindo a oxidação de ácidos graxos e estimulando a sua captação. A produção de ceramidas ocorre no retículo endoplasmático por uma via biosintética que envolve quatro reações enzimáticas evolutivamente conservadas. É proposto que o aumento do conteúdo intracelular dessa espécie lipídica leva a inibição da proteína AKT, levando a redução da captação de glicose e redução do estoque de glicogênio (Galbo et al., 2011).

Intervenções farmacêuticas ou animais geneticamente modificados que levam a redução da síntese de ceramidas ou aumento da sua degradação são geralmente associados a aumento da sensibilidade à insulina. Inibição da enzima Spt (enzima da via de síntese das ceramidas) ou animais knockout para essa enzima apresentam melhoras na sensibilidade à insulina quando alimentados com dieta rica em gorduras ou apresentam obesidade genética (camundongos db/db) (Holland et al., 2007; Dekker et al., 2013). Entretanto a superexpressão da enzima ceramidase ácida (enzima que degrada as ceramidas), tanto no tecido adiposo quanto no fígado, restaura a sensibilidade à insulina em camundongos alimentados com dieta rica em gorduras e reduz a esteatose hepática (Xia et al., 2015).

Dessa forma, observamos que diversos estudos de intervenção em roedores e estudos de perfil em humanos revelam prováveis papéis das ceramidas e DAG na resistência à insulina hepática e muscular associada com o excessivo consumo de nutrientes. Possíveis terapias que levam a redução dessas espécies de lipídios podem ser uma promessa para o tratamento de distúrbios metabólicos associados com a obesidade.

O mecanismo causador da resistência à insulina associada a obesidade é o consumo excessivo de calorias. O mecanismo celular descrito acima envolvendo a ativação de novas PKCs, tanto no fígado quanto no músculo, é uma resposta celular ao excesso crônico de uma das principais macromoléculas biológica, a gordura. Entretanto, outras respostas celulares ao excesso de nutrientes também têm sido associadas a resistência à insulina. Uma dessas respostas é a ativação pelo estresse de retículo endoplasmático (estresse de RE) da unfolded protein response (UPR).

A UPR é um complexo e bem conhecido mecanismo que permite que a célula corresponda a demanda de síntese de proteína à capacidade sintética de proteína (Dillin et al., 2014). Existem três ramos da UPR que são controlados por proteínas integrantes da membrana do RE: fator de iniciação eucariótica semelhante a PKR 2 quinase (PERK), enzima requeredora de inositol 1 (IRE1), e ativador do fator de transcrição 6 (ATF6) (Hotamisligil, 2010). Normalmente, essas três proteínas são mantidas inativas por ligação da chaperona BiP / GRP78 a PERK, IRE1 e ATF6; o acúmulo de proteínas mal dobradas leva a dissociação da BiP e ativação da UPR (Hotamisligil, 2010). Efetores a jusante na resposta de estresse de RE com funções propostas na regulação metabólica inclui NF- κ B e c-Jun NH2-terminal quinase (JNK).

Os marcadores de estresse de RE foram primeiramente associados a obesidade e resistência à insulina em 2004, quando foi observado em camundongos obesos ob/ob aumento da fosforilação dos marcadores de estresse de RE como eIF2 α , PERK e JNK no fígado (Ozcan

et al., 2004). Além disso, também foi observado que a indução química do estresse de RE levou a uma redução da sinalização da insulina associada com o aumento da fosforilação de JNK (Lee et al., 2003). Esses achados iniciais da ativação da UPR na obesidade e resistência à insulina tem sido repetidamente observado em fígados de camundongos (Nakatani et al., 2005), fígados de humanos (Kumashiro et al., 2011) e tecido adiposo de roedores (Gregor et al., 2009), sendo, portanto, uma via importante de estudo em modelos de resistência à insulina induzida pelo consumo de dieta rica em gordura.

Outro mecanismo comumente associado a complicações metabólicas tem sido a inflamação de baixo grau e crônica. Observações empíricas de que pacientes sépticos apresentam resistência à insulina (Clowes et al., 1978) e, posteriormente, que pacientes diabéticos e obesos possuem elevação crônica de citocinas (Bunout et al., 1996; Visser et al., 1999) sugestionou que uma ativação patológica do sistema imune inato poderia causar resistência à insulina. Estudos subsequentes em modelos de roedores obesos de resistência à insulina demonstraram um aumento da concentração de TNFalfa no tecido adiposo (Hotamisligil et al., 1993). Além disso, a expressão de TNFalfa no tecido adiposo de humanos obesos estava aumentada e foi associada com resistência à insulina e, interessantemente, foi reduzida com a perda de peso (Hotamisligil et al., 1995; Kern et al., 1995). Outros estudos demonstraram que o defeito na sinalização da insulina podia ser atribuído a fosforilação do IRS-1 em serina (resíduo 307) pela ativação da JNK1, fornecendo uma ligação mecanicista plausível entre inflamação e resistência à insulina (Hotamisligil et al., 1996).

Além disso, a falta de TNFalfa em camundongos protegeu esses animais contra a resistência à insulina induzida por obesidade (Uysal et al., 1997) e a ablação do receptor de TNFalfa especificamente no fígado reduziu a resistência hepática à insulina nesses animais (Bluemel et al., 2020).

Esses resultados sugerem que a resposta inflamatória a obesidade pode desempenhar um papel importante em seus efeitos nocivos, tornando crucial o entendimento dos mecanismos moleculares que conectam a obesidade e resistência à insulina ao excesso de ingestão calórica. Esses conhecimentos podem render interessantes alvos terapêuticos com os quais poderiam bloquear o ciclo de obesidade e suas complicações devastadoras.

1.3 Estradiol e o Receptor de estrogênio alfa

Nas últimas décadas, dados provenientes tanto de estudos clínicos como de estudos experimentais revelaram que, além de seu papel central no desenvolvimento sexual e reprodução, o estradiol (mais potente estrogênio) contribui enormemente para a homeostase glicêmica (Louet et al., 2004). De fato, a redução da concentração de estrogênio durante a menopausa é associada com o aumento de gordura visceral e, por sua vez, doenças metabólicas como resistência à insulina, DM2 e doenças cardiovasculares. Corroborando com isso, foi demonstrado que a sensibilidade à insulina é maior em mulheres antes da menopausa do que em homens (Nuutila et al., 1995), e a terapia de reposição hormonal com estrogênio em mulheres após a menopausa reduziu o risco de desenvolvimento de DM2 (Margolis et al., 2004).

Estudos experimentais também demonstram a importância do estradiol na homeostase metabólica. Aumento do peso corporal associado com aumento da gordura corporal é observado tanto em ratas (Camporez et al., 2011) quanto em camundongos fêmeas (Camporez et al., 2013) ovariectomizadas. Além disso, tanto camundongos machos quanto fêmeas que não possuem a enzima aromatase (enzima responsável pela etapa final da síntese de estrogênios) apresentaram aumento do peso corporal, gordura corporal e hipertrofia dos adipócitos (Jones et al., 2000). De fato, demonstramos recentemente que o tratamento com estradiol em camundongos fêmeas ovariectomizadas e alimentadas com dieta rica em gorduras reduziu o peso corporal e percentual de gordura, além do aumento da sensibilidade à insulina (Camporez et al., 2013). Esses efeitos do estradiol no peso corporal e sensibilidade à insulina foram associados a uma redução do conteúdo ectópico de lipídios, tanto no fígado quanto no músculo, principalmente a redução de diacilglicerol (DAG) o que, por sua vez, levou a uma redução da ativação das PKC ϵ (fígado) e PKC θ (músculo), aumentando a sensibilidade à insulina.

Além disso, foi sugerido que essas ações metabolicamente benéficas do estradiol são mediadas pelo receptor de estrogênio alfa (ER α), já que camundongos que não possuem esse receptor também apresentam obesidade (Heine et al., 2000). Recentemente foi demonstrado que a ativação do ER α aumenta a atividade mitocondrial e metabolismo sistêmico, protegendo camundongos fêmeas ovariectomizadas contra obesidade induzida por dieta rica em gorduras (Hamilton et al., 2016). Esse efeito do ER α sobre o metabolismo mitocondrial também foi demonstrado especificamente em músculo esquelético. Animais sem o ER α especificamente em músculo esquelético demonstram reduzida atividade mitocondrial, aumento ectópico de

lipídeos e defeito no turnover mitocondrial, levando a intolerância à glicose e resistência à insulina (Ribas et al., 2016). Interessantemente, animais sem o ER α especificamente no fígado apresentam aumento do depósito de TAG hepático e aumento da susceptibilidade de DHGNA induzida por dieta rica em gorduras (Han et al., 2014). Entretanto, a função do ER α no fígado em relação ao metabolismo energético, sensibilidade à insulina e depósito de outras espécies de lipídeos biologicamente ativos (como DAG e ceramidas) ainda não foi completamente estudado.

Dessa forma, nossa hipótese é de que animais com deleção hepática do ER α irão apresentar esteatose hepática associado a intolerância à glicose e resistência hepática à insulina.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar *in vivo* a função do ER α sobre o metabolismo energético hepático utilizando animais com deleção do ER α especificamente no fígado.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da ausência de ER α sobre:

- Acúmulo hepático de lipídeos (TAG, DAG e ceramidas).
- Expressão gênica e proteica de marcadores inflamatórios.
- Tolerância à glicose (GTT).
- Resistência à insulina por meio de clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico.

3. Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas e machos com background C57BL/6J. Para o experimento, animais de 8 semanas de vida foram alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) contendo 45% das calorias provenientes de gordura (*D12451, Research Diets, NJ, USA*) por 4 semanas. Após essas 4 semanas os animais foram utilizados para os experimentos. Os animais utilizados para os experimentos foram animais *knockout* para o ER α especificamente no fígado (L-ER α KO) e animais com expressão normal de ER α para controle. Esses animais foram gerados através do sistema Cre-Lox. Foram utilizados animais ER α -*floxed* junto com animais albumina-Cre para obtenção dos animais L-ER α KO.

Os animais foram genotipados segundo o protocolo de genotipagem (The Jackson Laboratory master protocol: *B6.Cg-Speer6-ps1Tg(Alb-cre)21Mgn/J*)

Os animais foram mantidos em caixas plásticas, em ambiente com temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), sob ciclo claro-escuro de 12 horas e com alimentação *ad libidum*.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (Protocolo 041/2021).

3.2 Conteúdo Tecidual de Triglicerídeos

Após 6 horas de restrição alimentar, os animais foram eutanasiados e os tecidos retirados para análise do conteúdo de lipídeos. Triglicerídeos (TAG) tecidual foram extraídos usando o método de Bligh e Dyer (Bligh and Dyer, 1959) e mensurado usando um reagente para TAG (Bioclin).

3.3 Coloração Oil Red O (ORO)

Fragmentos de fígado foram incluídos em um molde com tissue-tek (Thermo Scientific) e congelados em nitrogênio líquido (N₂). 12 μm (três seções por lâmina) foram feitas a partir de diferentes partes do tecido. Foi utilizado um criostato (Microm H560) para realizar os cortes. As lâminas foram coradas com ORO (5 min), depois lavadas em água corrente (30 min). As imagens (10 de cada animal) foram obtidas em microscópio Nikon Eclipse Ti-U na objetiva de 20X, com câmera digital Nikon DS-Ri1 e software NISElements BR 3.1. A quantificação do acúmulo de gordura no tecido foi realizada por meio do Image J.

3.4 Conteúdo Tecidual de Ceramidas e Diacilglicerídeos

Para a extração de ceramidas, aproximadamente 50 mg de tecido serão homogeneizados com 1 ml de metanol:clorofórmio e um padrão interno C17 foi adicionado e Água foi então adicionada para criar uma fase orgânica e aquosa. A amostra foi centrifugada para separar a camada orgânica, a camada orgânica foi coletada e seca durante duas horas em um evaporador de nitrogênio e após a secagem reconstituída com hexano >95%. O extrato do metabólito lipídico foi então submetido à cromatografia líquida (LC) – espectrometria de massas em tandem (MS/MS). Uma fonte de ionização química de pressão atmosférica de modo positivo em interface com um espectrômetro de massa tandem 6500 Qtrap (SCIEX, Framingham, MA, EUA) em conjunto com um sistema Shimadzu Prominence HPLC (Shimadzu, Columbia, MD, EUA). As seguintes espécies foram monitoradas usando um método de monitoramento de reação múltipla (MRM): C16 520.6/264.2, C18 548.6/264.2, C20 576.8/264.2, C22 604.8/264.2, C24:1 631.0/264.2, C24 633.0/264.2 e IS C17 534.6/264.2. O teor total de ceramidas foi expresso como a soma das espécies individuais. Para o diacilglicerol (DAG), aproximadamente 50 mg de tecido foram homogeneizados em CHCl₃-metanol (2:1 v/v) gelado contendo 0,01% de hidroxitolueno butilado e os padrões internos 1,2-dinonedecanoína e 1,2,3- triheptadecanoato. Água e clorofórmio adicionados para criar uma fase orgânica e aquosa. Após a centrifugação, a camada orgânica foi coletada, seca sob fluxo de nitrogênio e reconstituída com hexano > 95%. O diacilglicerol é separado do TAG com colunas de diol pré-condicionadas (Waters Sep Pak Cartridge WAT020845; Waters, Milford, MA, EUA) e eluído com hexano-acetato de etila (85/15 v/v) sob baixa pressão negativa. Os extratos de metabólitos lipídicos foram submetidos à análise por LC-MS/MS. Uma fonte de Application Program Interface (API) foi interfaceada com um espectrômetro de massa tandem API 6500 QTRAP (SCIEX) em conjunto com um Shimadzu Prominence HPLC System (Shimadzu). As seguintes espécies foram monitoradas usando um método MRM: C16:0–16:0 551.6/239.3, C16:0–18:0 579.7/239.3, C16:0–18:1 577.6/239.3, C16:0–18:2 575.7/236.2, C18:0–18:0 607.7/267.3, C18:0–18:1 605.7/267.3, C18:0–18:2 603.7/267.3, C18:1–18:1 603.7/265.3, C18 : 1–18:2 601.7/265.3, C16:0–20 :4 599.7/239.3, C18:0–20:4 627.7/267.3, C20:4–20:5 645.7/287.3, C17:0–17:0 579.7/253.3, C19:0–19:0 635.8/281.4. O conteúdo total de diacilglicerol foi expresso como a soma das espécies individuais. Para minimizar quaisquer possíveis efeitos de confusão dos efeitos da matriz em nossas análises de LC-MS/MS, todas as comparações foram feitas nas diferenças relativas entre o conteúdo de DAG/ceramidas no fígado de machos vs. fêmeas

ou controle vs. L-ER α KO analisados no mesmo Execução de LC-MS/MS. Todas as medições lipídicas foram feitas a partir de tecidos colhidos de camundongos após jejum de 6 h (Camporez et al., 2019)

3.5 Produção Hepática de Triglicerídeos

Para determinar a taxa de produção de TAG hepática em camundongos, as amostras de sangue foram coletadas após o jejum durante a noite para determinar os níveis basais de TAG no plasma. Após coleta de sangue basal, os animais foram injetados intraperitonealmente com poloxamero 407 (1 g / kg de peso corporal, Sigma-Aldrich, EUA) para inibir a atividade LPL. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos 1, 2, 3 e 4h após a injeção. A taxa de produção de VLDL-TAG será calculada pelo aumento do nível de TAG plasmático a partir da linha de base (Millar et al., 2005; Camporez et al., 2015).

3.6 Avaliação da expressão gênica – reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram usados o tecido do fígado para RT-PCR. O tecido foi retirado e 50 mg da amostra foi homogeneizada em 1 mL de trizol (Life Technologies) para extração do mRNA. A amostra foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C), foi adicionado 200 μ L de clorofórmio e incubado por 15 min a temperatura ambiente, centrifugado por 15 min a 2°C a 12000 rpm. A fase aquosa que contém o RNA foi separada, e em seguida foi adicionado 500 μ L de isopropanol e a amostra foi colocada no freezer -20°C por 1 h. A amostra foi centrifugada por 10 min a 4°C a 12000 rpm, depois passou por um processo de lavagem, o sobrenadante foi descartado, e foi adicionado 1 mL de álcool 75%, centrifugado por 10 min a 4°C a 12000 rpm, essa etapa foi realizada 2 vezes seguidas. O sobrenadante foi descartado e o RNA passará por uma etapa de dissolução, foi adicionada 50 μ L de água livre de RNase. A leitura da concentração de RNA foi avaliada a 260 nm e a pureza partir da relação 260/280 nm no aparelho nanodrop (DeNovix). Em seguida, o cDNA foi preparado através da reação de transcrição reversa (High-Capacity cDNA kit, Applied Biosystems). Foi preparado um mix contendo os componentes: tampão RT 10x, mix dNTP 25x 100 Mm, primers RT 10x, transcriptase reversa, inibidor de RNase, água livre de RNase, e adicionado a amostra. A amostra foi levada ao termociclador. A expressão gênica foi analisada por RT-PCR (Rotor Gene Q - Qiagen) e sonda fluorescente SYBR Green (Platinum® SYBR® Green

qPCR Supermix UDG, Invitrogen). As análises da expressão gênica foram realizadas usando um método descrito por Livak e Schmittgen (2001) e Pfaffl (2001).

3.7 Western Blot

Os tecidos dos animais (fígado) foram pulverizados e homogeneizadas em tampão RIPA a 4°C (Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM e PMSF 2 mM) com homogenizador Polytron PTA 20S (*Brinkmann Instruments*). Os extratos teciduais foram centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 20 minutos para remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o conteúdo proteico total será quantificado utilizando-se o método de Bradford (*BioRad*). Amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT 200 mM e 30 µg de proteínas totais solubilizadas dos fragmentos do fígado, músculo esquelético ou tecido adiposo dos camundongos. Essas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (extrato total). Em cada gel haverá um marcador com peso molecular com valores estabelecidos.

A transferência das proteínas separadas no gel será realizada eletricamente para uma membrana de PVDF, por meio de um sistema de transferência *semidry* (Bio-Rad) por 120 minutos. As membranas de PVDF foram incubadas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4°C por 2 horas para reduzir a ligação inespecífica de proteínas nas membranas. Em seguida, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos: fosfo- AKT2^{ser473} (*Signalway Antibody, USA*), AKT2 (*Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA*) e . Todas as membranas foram incubadas com GAPDH (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA*) para controle da quantidade de proteína na membrana.

Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora (3% de BSA ao invés de leite), por 12 h a 4°C e a concentração de cada anticorpo será de 1:200 a 1:1000. Em seguida as membranas foram lavadas com a solução bloqueadora sem leite ou BSA por 30 minutos. Estas membranas foram incubadas com o segundo anticorpo, conjugado com peroxidase, por 2 h em temperatura ambiente e, logo após, com a solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit comercial (*ECLPlus, Amersham*). A emissão de luz será detectada e visualizada usando filmes radiográficos. A intensidade das bandas será quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (*Scion*

Image Software, MD, USA).

3.8 Avaliação *in vivo* da sensibilidade à insulina

Para avaliação *in vivo* da sensibilidade à insulina será realizado *clamp* normoglicêmico-hiperinsulinêmico como descrito anteriormente (Camporez et al., 2013), com algumas modificações. Para realização, será implantado um cateter na veia jugular e um cateter na artéria carótida 7 dias antes do *clamp* normoglicêmico-hiperinsulinêmico. Para medida da produção endógena de glicose (EGP) basal, será realizada a infusão de [3-³H]-glicose (*Perkin- Elmer Life Sciences, USA*) em um ritmo de 0.05 µCi/min por 120 minutos após 6 horas de restrição alimentar através da veia jugular. Após essa infusão basal, o *clamp* normoglicêmico-hiperinsulinêmico será conduzido em animais acordados por 120 minutos com uma infusão inicial de insulina por 3 minutos (29 mU/kg) seguida por infusão contínua de 3 mU/kg.min⁻¹ de insulina humana (*Novolin; Novo Nordisk*). Também será realizada uma infusão contínua de [3-³H]-glicose (0.1 µCi/min), e uma infusão variável de dextrose (20%) para manutenção da glicemia normal (~120 mg/dL). Após 75 minutos do início do *clamp* será injetado um bolus de 10µCi de 2-deoxy-d-[1-¹⁴C]glicose (*PerkinElmer*) para estimativa da captação tecidual de glicose estimulada por insulina. Amostras de plasma foram coletadas pela através da artéria carótida nos tempos 0, 15, 30,45, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 minutos (Ayala et al., 2010). Além disso, os animais receberam de forma intravenosa uma solução contendo albumina mimetizando o plasma artificialmente durante o período de infusão com insulina, para compensação do volume de sangue retirado para amostras de plasma. Ao final do *clamp*, os animais foram anestesiados com uma injeção de pentobarbitol sódico (150 mg/kg) e os tecidos adiposo peri-gonadal e muscular (gastrocnêmio + sóleos) e o fígado foram retirados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido, e então estocados em -80°C para subsequente análise.

3.9 Teste de Tolerância à Glicose

Após restrição alimentar de 6 horas, os camundongos foram injetados intraperitonealmente com glicose (1 mg / kg de peso corporal - 10% de dextrose). As amostras de sangue para mensuração da glicose e insulina plasmática foram retiradas pelo sangramento da cauda aos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a injeção.

3.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Bonferroni. Quando necessário será realizado o teste t para amostras não pareadas. O nível de significância mínima aceitável será $p < 0,05$

4. Resultados e Discussão

4.1 Composição Corporal

Os animais foram pesados antes do início da alimentação com a dieta hiperlipídica e a pesagem final foi feita antes da eutanásia dos animais. Foi observado que ao longo do tempo animais alimentados com dieta hiperlipídica possuem um aumento de peso significativo quando comparado a animais alimentados com dieta padrão. Mesmo considerando as diferenças entre os sexos (Yang, Y. 2014). Ambos os grupos não apresentaram diferença significativa de massa total inicial, também não observamos diferença quanto a massa final dos animais após 4 semanas de dieta (Figura 1). Também não observamos diferença significativa quanto ao ganho de massa dos animais durante o período de dieta (Figura 2). Foi sugerido que as ações metabolicamente benéficas do estradiol podem ser mediadas pelo $ER\alpha$, já que camundongos knockout para esse receptor também apresentam obesidade (Heine et al., 2000). Porém, os animais utilizados em nosso estudo possuem knockout tecido específico, diferente do encontrado na literatura, sendo assim, tal alteração não foi suficiente para que haja uma mudança significativa quanto a massa total dos animais.

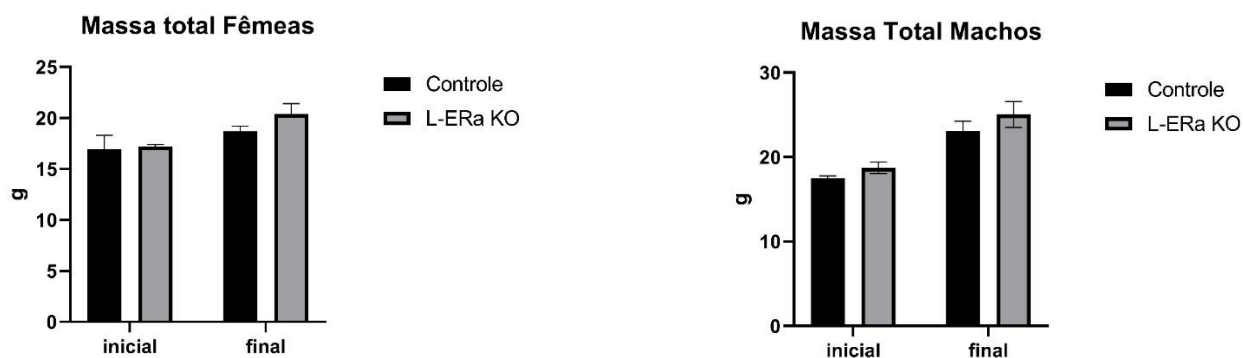


Figura 1: Comparação entre massa total inicial e final. Fêmeas e Machos. Controle x L-ERα KO.

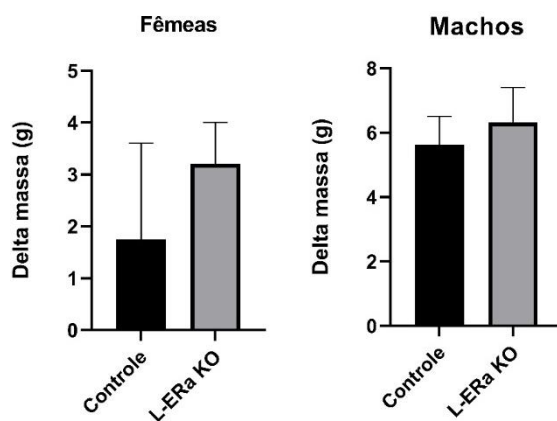


Figura 2: Comparação ganho de massa durante 4 semanas de dieta. Fêmeas e Machos. Controle X L-ERa KO.

4.2 Teste de tolerância a glicose

Após 4 semanas de dieta, os animais foram submetidos a jejum por 6 horas, garantindo assim que sua glicemia estivesse em níveis basais.

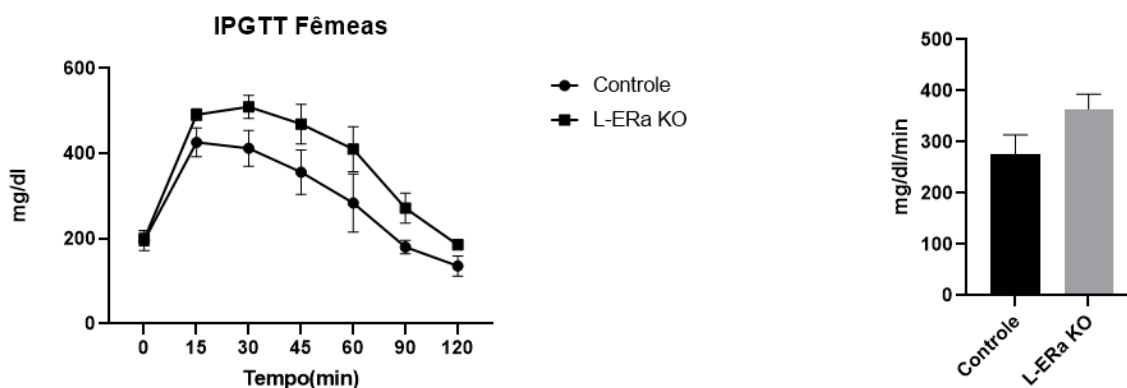


Figura 3: Teste de tolerância a glicose. Curva glicêmica e área sob curva. Fêmeas Controle X L-ERa KO

Durante o teste de tolerância a glicose, podemos observar uma diferença significativa ($p < 0,05$) quanto a glicemia das fêmeas no tempo de 30 minutos após a injeção intraperitoneal de glicose (Figura 3).

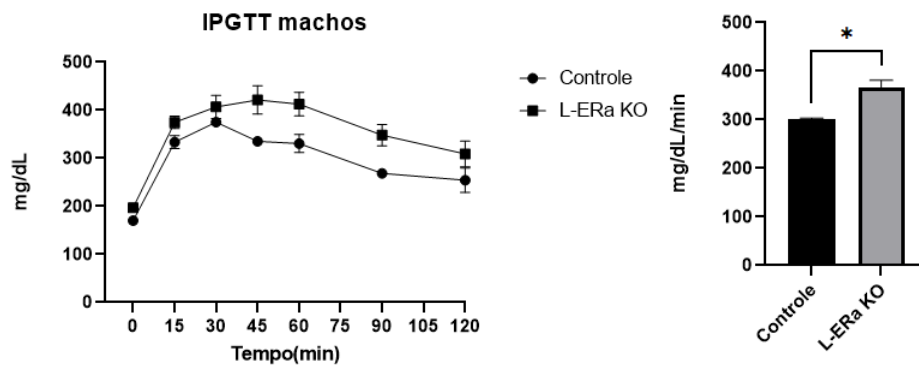


Figura 4: Teste de tolerância a glicose. Curva glicêmica e área sob curva. Machos Controle X L-ERa KO.

Quando avaliamos a tolerância a glicose do grupo de animais machos, podemos ver diferença significativa entre os grupos a partir do tempo 45 minutos ($P < 0,05$) (Figura 4).

Os animais L-ERa KO de ambos os sexos demonstraram maiores valores glicêmicos quando comparados aos animais controle. Tal resultado corrobora com a literatura, onde foi demonstrado que o estradiol possui papel fundamental na regulação glicêmica, promovendo melhora significativa na captação de glicose (Camporez et. Al. 2013). Foi demonstrado que a ausência do receptor de estrogênio pode gerar uma supressão defeituosa da produção endógena de glicose hepática (Bryzgalova, G. 2006). Sendo assim este resultado sugere que a ausência do receptor, especificamente no fígado, pode promover graves alterações nos valores glicêmicos promovendo um estado de hiperglicemia. O estado de hiperglicemia pode ser gerado por defeitos em diferentes vias como glicogenólise e gliconeogênese. Tanto a via de glicogenólise quanto a via de gliconeogênese são reguladas pela sinalização de insulina, sendo assim, prejuízos causados a essa via podem diretamente afetar a homeostase glicêmica.

4.3 Conteúdo Hepático de Triglicerídeos.

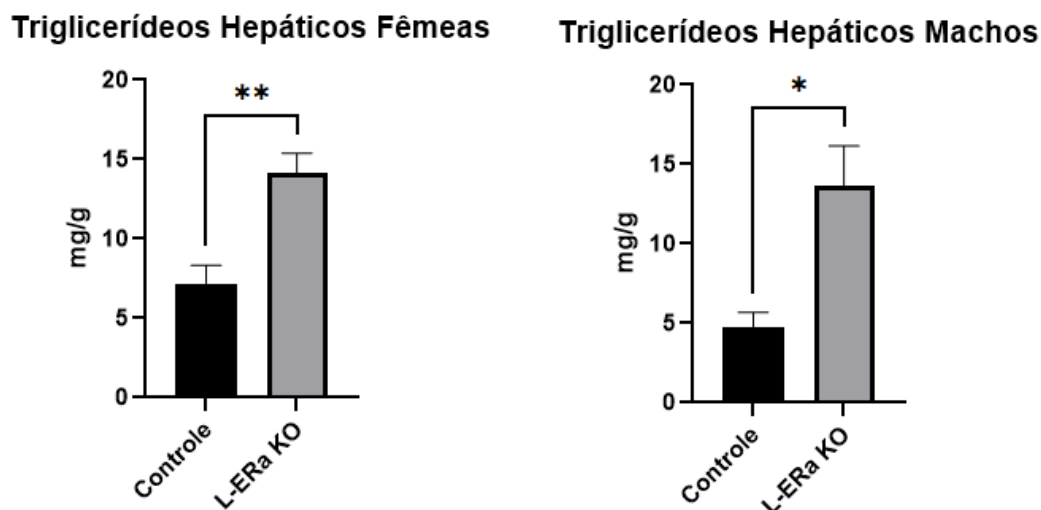


Figura 5: Conteúdo hepático de triglicerídeos em machos e fêmeas * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Foi realizada a eutanásia dos animais e o fígado foi completamente coletado. Uma amostra de cerca de 50 mg de tecido foi utilizada para a extração de triglicerídeos seguindo o método de Bligh e Dyer (Bligh and Dyer, 1959). O acúmulo hepático de triglicerídeos e DAG foi fortemente associado ao desenvolvimento de DM2 em humanos e roedores (Samuel VT. 2010). Podemos observar diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) (Figura 5), onde os animais L-ER α KO demonstraram valores cerca de 3 vezes maiores, quando comparados aos animais controle. Esse resultado corrobora com a literatura onde animais ovariectomizados apresentaram um aumento significativo no acúmulo hepático de triglicerídeos, porém, quando esses animais receberam a reposição de estradiol não houve diferença no acúmulo tecidual de triglicerídeos hepáticos. Além disso, animais L-ER α KO ovariectomizados quando receberam a reposição de estradiol não se beneficiaram de tal efeito mantendo os níveis elevados de triglicerídeos hepáticos (Han, S.-i. 2014).

4.4 Quantificação de lipídios no plasma.

O plasma coletado no momento da eutanásia foi utilizado para a quantificação de triglicerídeos através de kit comercial.

Nós podemos observar diferença significativa no acúmulo de triglicerídeos no plasma ($p < 0,05$) (Figura 6). Sendo que os animais L-ER α KO demonstraram menor acúmulo de lipídios quando comparados com os animais controle. Esses dados juntos a quantificação de lipídios hepáticos, nos fizeram questionar se a ausência do recetor poderia de alguma forma estar modificando o processo de exportação de lipídios hepáticos, mais especificamente triglicerídeos em forma de VLDL. Para avaliar esse processo realizamos um teste de exportação de colesterol.

Triglicerídeos Plasmáticos Fêmeas

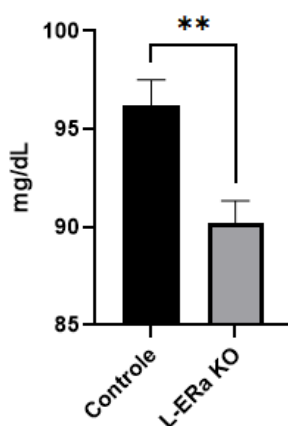


Figura 6: Quantificação de triglicerídeos presentes no plasma de fêmeas. ** $p < 0,01$

Para a quantificação da taxa de exportação de lipídios hepáticos, os animais foram mantidos em jejum por um período de 6 horas, para garantirmos que os lipídios circulantes no sangue não eram providos da dieta. Após esse período, foi administrado um inibidor de lipase lipoproteica (Poloxamero), seguindo o protocolo de Millar (Millar et al., 2005). Com o objetivo de impedir a absorção do TG por outros tecidos e permitindo assim que possamos acompanhar o acúmulo dos lipídios na corrente sanguínea em relação ao tempo.

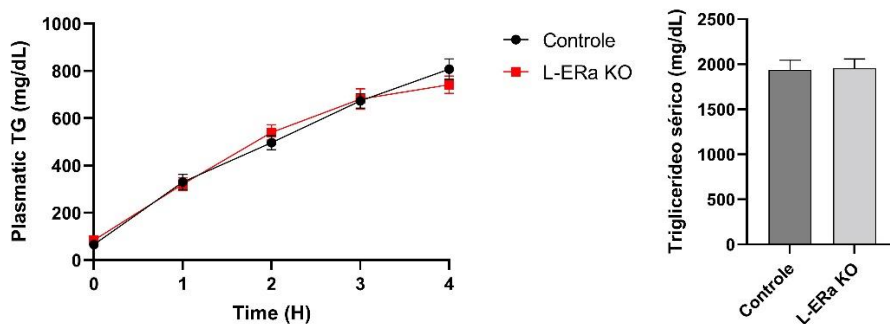


Figura 7: Teste de exportação de lipídios hepáticos em fêmeas. Curva de concentração de lipídios hepáticos (mg/dL) x Tempo. Área sob a curva

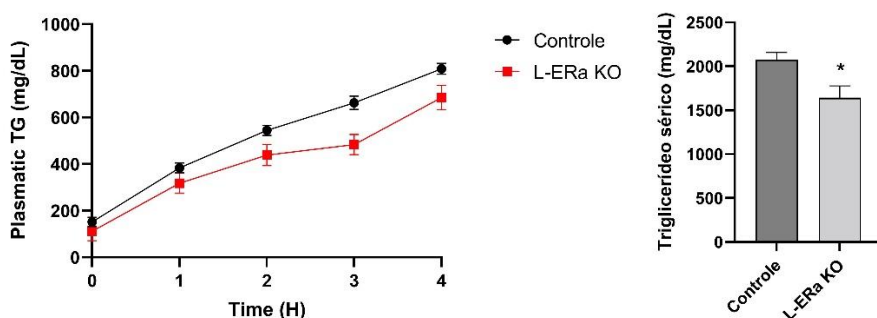


Figura 8: Teste de exportação de lipídios hepáticos em machos. Curva concentração de lipídios hepáticos(mg/dL) x Tempo. Área sob a curva $P < 0,05$

Nós podemos observar diferença significativa na exportação de lipídios hepáticos nos machos, onde os machos L-ER α KO exportaram valores sobre o tempo menores de triglicerídeos, quando comparados aos animais controle. Foi demonstrado que a ausência do estradiol pode alterar os níveis de exportação de triglicerídeos e VLDL através da diminuição da expressão de proteínas proteína de transferência de triglicerídeos microsômicos (MTP), sendo que animais ovariectomizados possuem uma menor expressão relativa dessa proteína e quando feita a reposição de estrogênio, a expressão proteica se torna semelhante a animais não ovariectomizados (Barsalani, R. 2011). Sendo assim há indícios de que o ER α pode atuar no processo de exportação de lipídios hepáticos em forma de VLDL e em sua ausência, as taxas de exportação desses lipídios são prejudicadas, promovendo assim um maior acúmulo de lipídios hepáticos e favorecendo o desenvolvimento da DHGNA.

4.5 Quantificação de Diacilglicerídeos e ceramidas por Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Utilizando a técnica de LC-MS/MS foi possível quantificar diferentes espécies lipídicas, nos permitindo associar as diferentes espécies com os mecanismos de indução de resistência à insulina. Até o momento, os mecanismos associados a causa da resistência hepática a insulina e consequente diabetes, ainda não foram completamente esclarecidos (Petersen and Shulman, 2018). Porém, o acúmulo ectópico de lipídios, principalmente DAGs e ceramidas estão fortemente associados ao desenvolvimento da resistência à insulina (Chavez and Summers, 2012; Kusminski and Scherer, 2019; Petersen and Shulman, 2017). No fígado, o acúmulo de DAGs está associado a indução de resistência a insulina devido a mecanismos associados a ativação da PKC ϵ (Kumashiro et al., 2011; Raddatz et al., 2011; Samuel et al., 2004, 2007).

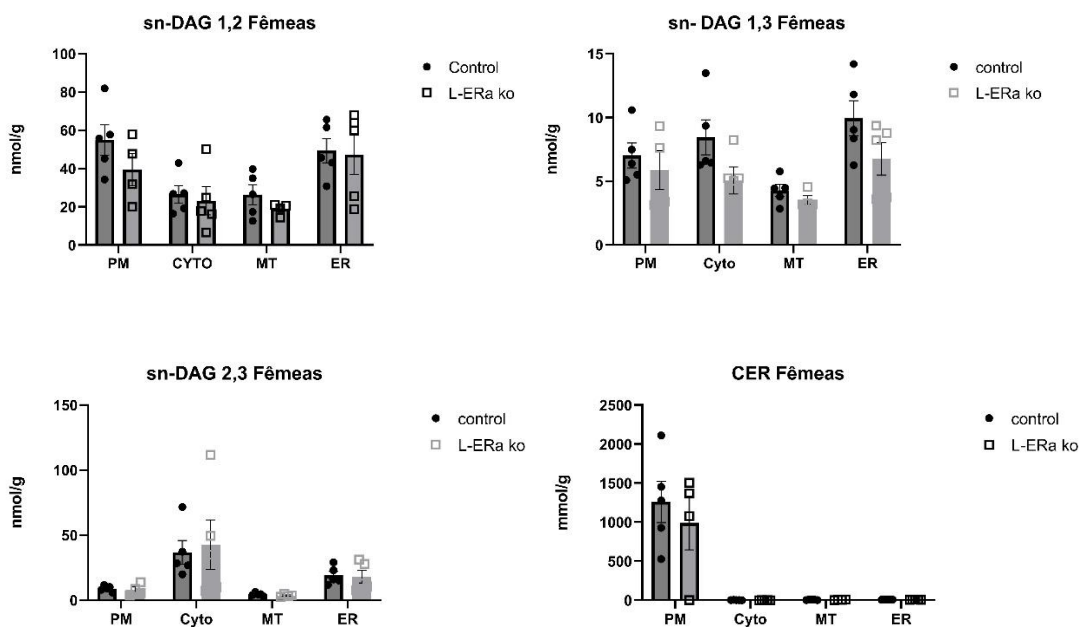


Figura 9: Quantificação de diferentes espécies lipídicas em fígado de camundongos fêmeas ERa Floxed (controle) e animais L-ERa KO. PM= Membrana plasmática. Cyto= Citoplasma. MT= mitocôndria. ER= Reticulo endoplasmático.

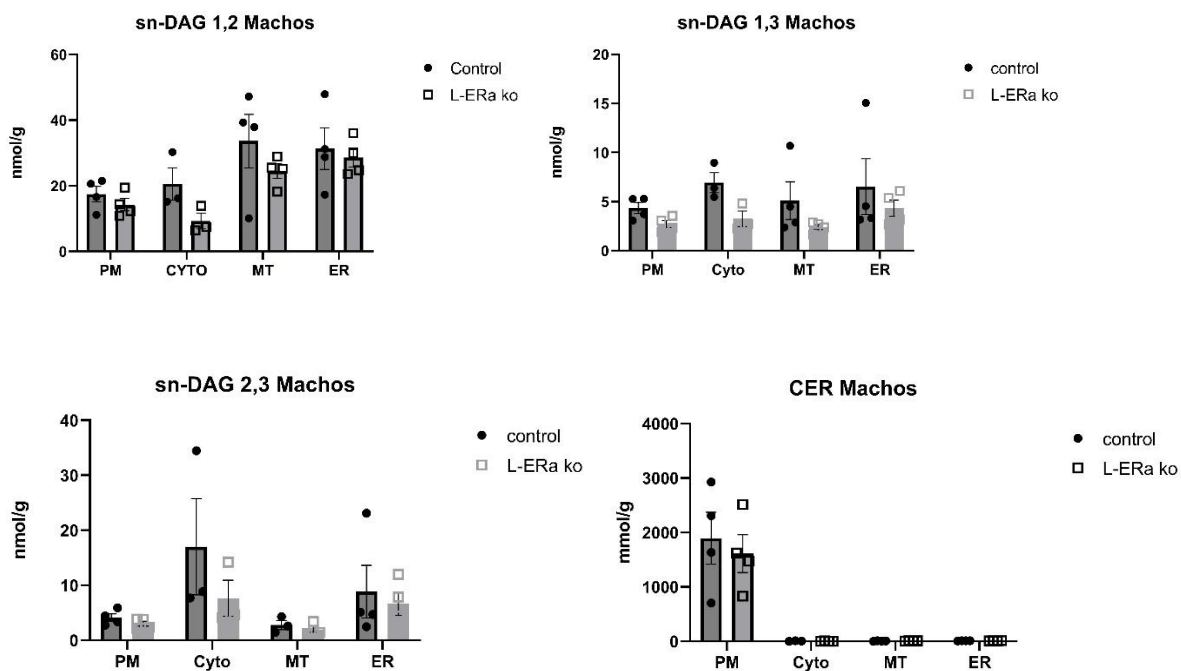


Figura 10: Quantificação de diferentes espécies lipídicas em fígado de camundongos machos *ERa Floxed* (controle) e animais *L-ERa KO*. PM= Membrana plasmática. Cyto= Citoplasma. MT= mitocôndria. ER= Reticulo endoplasmático.

Primeiramente as amostras foram pesadas individualmente e processadas para a compartimentação das células. Após a compartimentação foi possível obter os seguintes fragmentos: membrana plasmática, citosol, mitocôndria, reticulo endoplasmático e gotículas de lipídeos.

Após a compartimentação, os diacilglicerídeos e as ceramidas foram extraídos segundo o protocolo descrito anteriormente. Para controle da extração e posterior referência na quantificação, foram adicionadas as amostras os padrões DAG C19:0 C19:0 a uma concentração de 2,24 nmol e Ceramida C16 2,9 mmol. As amostras então foram injetadas em coluna cromatográfica para a separação das diferentes espécies e fragmentos lipídicos e após isso transferidas para um espectrômetro de massas acoplado a cromatografia líquida.

Não observamos diferença significativa entre as diferentes espécies lipídicas DAG's e cerâmicas, com relação aos seus diferentes fragmentos nos camundongos fêmeas (Figura 10).

Quanto aos machos, observamos que os animais KO sofreram uma diminuição significativa de deposição de lipídios em relação ao fragmento sn-DAG 1,3 no citosol ($p < 0,05$) (Figura 12). Também observamos uma tendência em relação aos outros compartimentos e fragmentos lipídicos, onde os animais KO apresentam uma menor concentração de lipídeos. Porém, não podemos relacionar tais resultados com qualquer mecanismo de desenvolvimento de resistência à insulina ou acúmulo de lipídios presente na literatura.

Esses dados nos indicam que diferentes mecanismos podem estar associados ao acúmulo de lipídios e intolerância à glicose observado neste estudo. Foi demonstrado que o acúmulo especificamente do sn-DAG 1,2 pode promover a alteração da fosforilação de resíduos que compõem o receptor de insulina na membrana da célula, que deixam de ser auto-fosforilados nos resíduos de tirosina 1158 e 1162, passando a ser fosforilados no resíduo de treonina 1160 (Lyu et al. 2020). Algumas espécies de ceramidas presentes no plasma de pacientes obesos diagnosticados com DM2, estão sendo associadas a mecanismos de resistência à insulina (Jacob M. Haus. 2009).

4.6 Expressão Gênica.

Avaliamos também a expressão de genes relacionados a inflamação, produção de lipídios e gliconeogênese. Foram avaliados os genes: Interleucina 4, 6 e 10 (IL-4, IL-6 e IL-10); Fator de necrose tumoral α (TNF α); Acetil-CoA-carboxilase (ACC); Ácido graxo sintase (Fasn); Sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1c) e Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK)

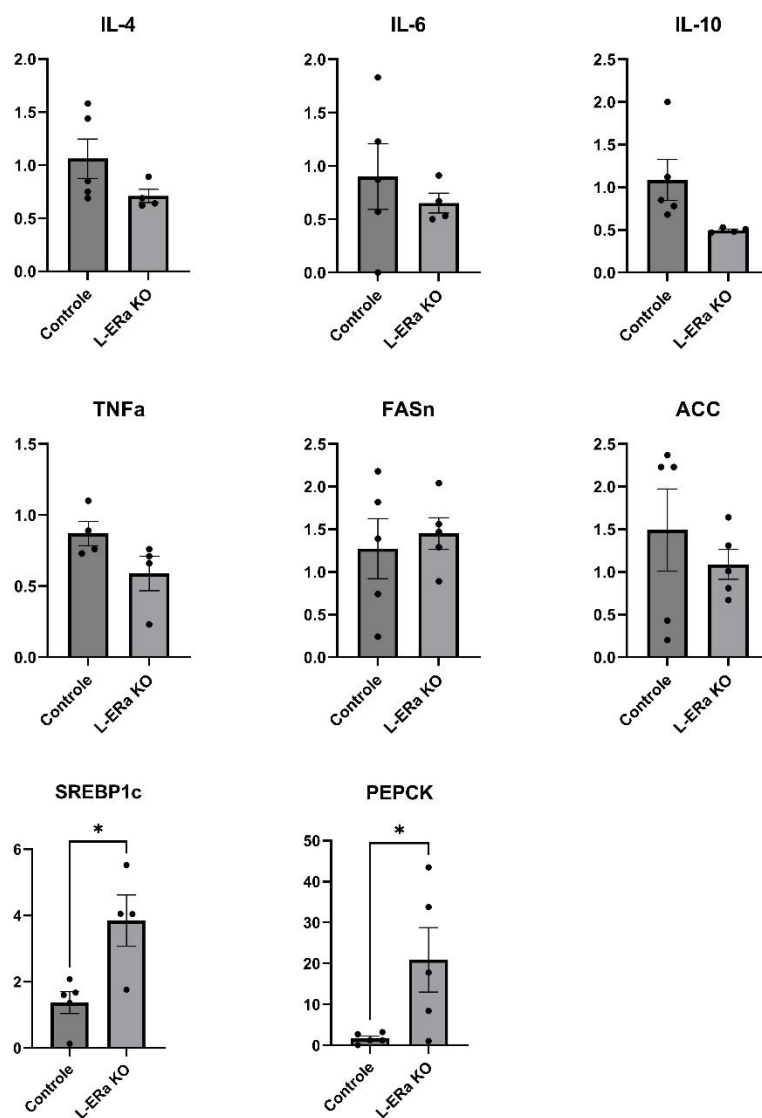


Figura 11: Expressão relativa genes pró e anti-inflamatórios (IL-4, IL-6, IL-10 e TNF α). Expressão relativa genes responsáveis pela síntese de lipídios (SREBP1c P<0,05; ACC e FASN P>0,05). Expressão relativa genes envolvidos no processo de gliconeogênese (PEPCK P<0,05). Machos

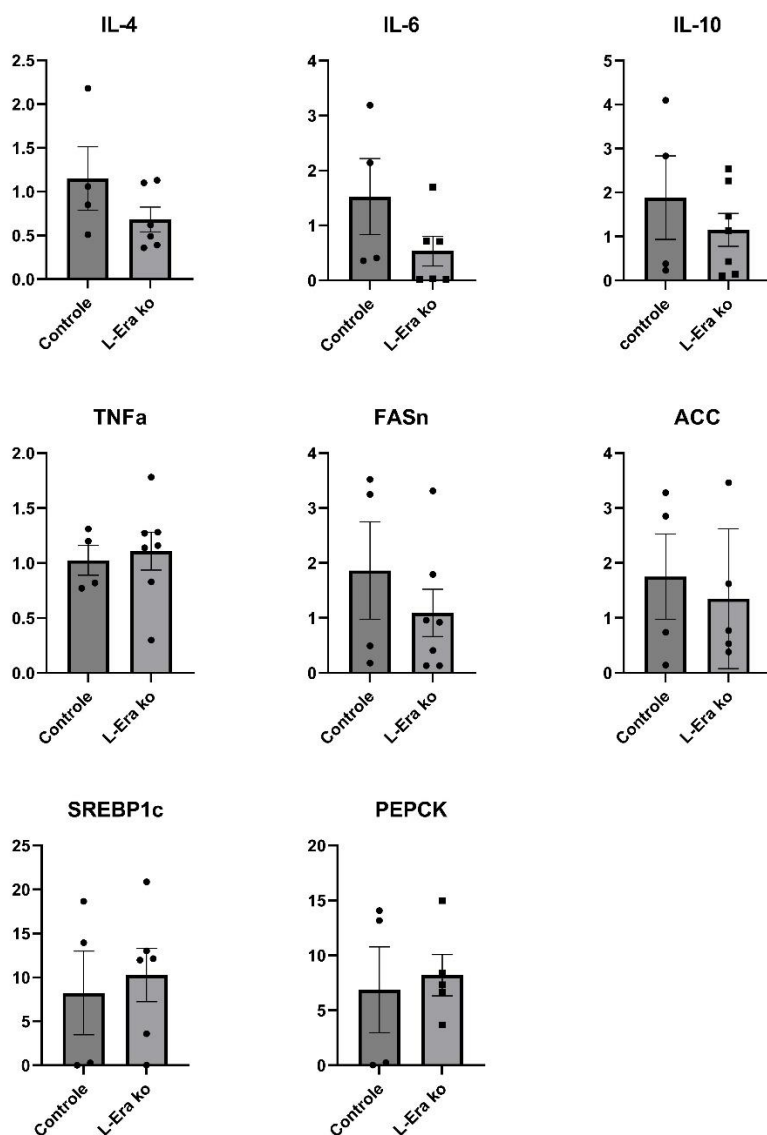


Figura 12: Expressão relativa genes pró e anti-inflamatórios (IL-4, IL-6, IL-10 e TNF α). Expressão relativa genes responsáveis pela síntese de lipídios (SREBP1c, ACC e FASN). Expressão relativa genes envolvidos no processo de gliconeogênese (PEPCK). Fêmeas.

Nós não observamos diferença significativa na expressão de genica das fêmeas. Também não observamos diferença significativa de genes envolvidos com processos pró e anti-inflamatórios nos machos, como já era esperado, já que as caracterizações da doença hepática gordurosa não alcoólica não possuem lesão inflamatória. Quanto a síntese de lipídios, podemos observar uma diferença significativa, na expressão de SREBP1c (Figura 11), sendo o principal gene regulatório no processo de síntese de lipídeos. Estudos demonstraram que a expressão total de SREBP1c no fígado e tecido adiposo pode ser regulada pela ingestão alimentar, já que animais em jejum possuem uma expressão reduzida do gene e após alimentados essa expressão volta a

níveis basais (Horton JD. 1998. Kim JB. 1998). Tal efeito pode ser atribuído pela liberação da insulina pós-prandial.

Foi observado que animais ovariectomizados possuem um aumento significativo na expressão de SREBP1c porém quando esses animais recebem a reposição de estradiol a expressão do gene se torna semelhante a animais SHAM (Paquette, Amélie. 2008). Além disso, foi observado que a ativação da via SCAP/SREBP é essencial para o desenvolvimento da esteatose hepática em indivíduos com DM2 (Moon YA. 2012). Não foi possível observamos diferença significativa na expressão de ACC e FASN, que regulam a síntese de lipídios *de novo*.

Um dos mecanismos chave pelo qual a insulina promove a regulação glicêmica é a repressão transcricional de genes gliconeogênicos, mediada principalmente por fatores de transcrição FOXO. FOXO1 é um alvo da enzima AKT bem caracterizado desempenhando importantes funções fisiológicas no hepatócito (Brunet A. 1999, Dong XC. 2008, Lin HV. 2011). A AKT fosforila três resíduos de FOXO1, Thr24, Ser256 e Ser319, embora outras enzimas também possam agir nesses locais (Brunet A. 1999, Ueda S. 2010). FOXO1 fosforilado deixa o núcleo, perdendo sua atividade de fator de transcrição (Brunet A. 1999). O FOXO1 ativo se liga ao coativador de transcrição peroxissoma ativado proliferativo receptor-coativador 1- (PGC1) para coordenar um programa de transcrição gliconeogênica envolvendo aumento da expressão de glicose-6-fosfatase (G6pc) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (Nakae J. 2001, Puigserver P. 2003). Nós observamos diferença significativa na expressão de PEPCK que diretamente regula a via de gliconeogênese. A PEPCK é a primeira enzima reguladora na gliconeogênese e converte oxaloacetato em fosfoenolpiruvato no citoplasma (Tuo, L. 2019). Foi demonstrado que a administração de estrogênio pode diminuir significativamente a expressão da enzima PEPCK, conseqüentemente diminuindo assim a capacidade de gliconeogênese (Ahmed-Sorour H. 1981). Além disso, animais ob/ob tratados com estrogênio tiveram uma diminuição de atividade e expressão da enzima glicose-6-fosfatase, podem assim contribuir para a normalização da glicemia em jejum (Borthwick EB. 2001). O conjunto desses dados demonstra que o efeito atribuído ao estradiol, promovendo uma diminuição significativa da ação de PEPCK e conseqüentemente aumento da gliconeogênese, está sendo promovido através do ER α .

4.7 Expressão proteica.

Avaliamos também uma proteína chave da via de gliconeogênese, a expressão proteica de PEPCK e também a via de sinalização de insulina AKT.

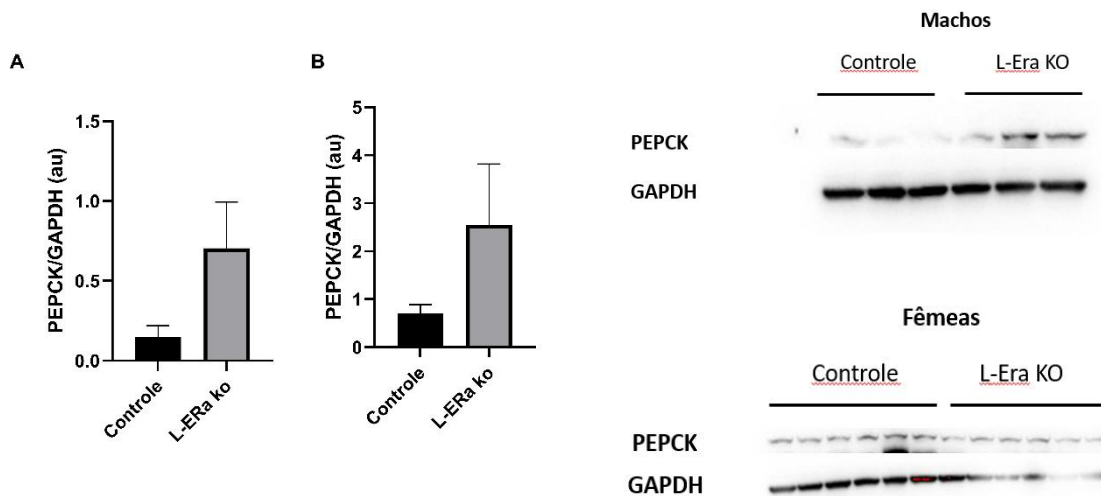


Figura 13: Expressão proteica PEPCK. A. Machos. B. Fêmeas.

Semelhante ao resultado obtido quando analisamos a expressão genica de PEPCK, podemos observar uma tendência ao aumento da expressão dessa enzima nos animais L-ER α KO de ambos os sexos. O aumento dessa enzima como discutido anteriormente pode estar relacionado aos elevados valores glicêmicos observados ao início do teste de tolerância a glicose e que o efeito inibidor sobre a expressão desta enzima promovido pela administração do estradiol é mediado através do ER α .

4.8 Resultados relacionados aos animais alimentados com HFD por 8 semanas

Devido aos resultados observados com o grupo de 4 semanas de dieta, decidimos estender o período de dieta para 8 semanas, visando assim, potencializar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre o metabolismo e assim, podermos evidenciar melhor os efeitos da ausência do ER α sobre o metabolismo.

6.8 Teste de Tolerância à Glicose.

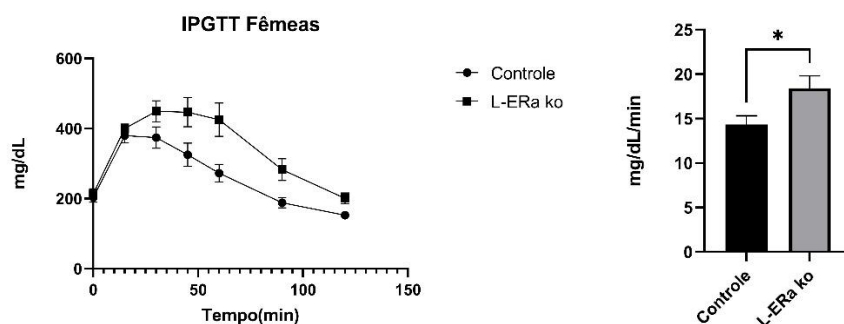


Figura 14: Teste de tolerância a glicose. Curva glicêmica e área sob curva. Fêmeas Controle X L-ERa KO

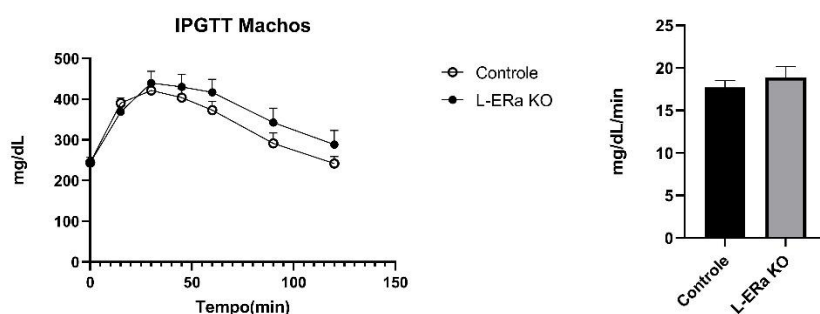


Figura 15: Teste de tolerância a glicose. Curva glicêmica e área sob curva. Machos Controle X L-ERa KO. 8 semanas.

Podemos observar que com 8 semanas de dieta, as fêmeas L-ER α KO demonstraram níveis de intolerância à glicose que não foi possível observarmos com 4 semanas de dieta (Figura 14). Enquanto os machos não podemos observar diferença significativa porém, podemos observar que

ambos os grupos obtiveram índices glicêmicos elevados durante o teste (Figura 15). Tal resultado nos leva a crer que a ausência do ER α nos machos permitiu que esses animais se tornassem intolerantes a glicose mais rapidamente, quando comparado as fêmeas, que só foi possível observarmos intolerância após um período mais longo de dieta.

4.9 Conteúdo hepático de triglicerídeos

Avaliamos nestes animais o acúmulo hepático de triglicerídeos, seguindo o mesmo método utilizado anteriormente. Além disso, realizamos cortes histológicos corados com OIL RED para a visualização das gotículas de lipídeos presentes no tecido (Camporez. 2014)

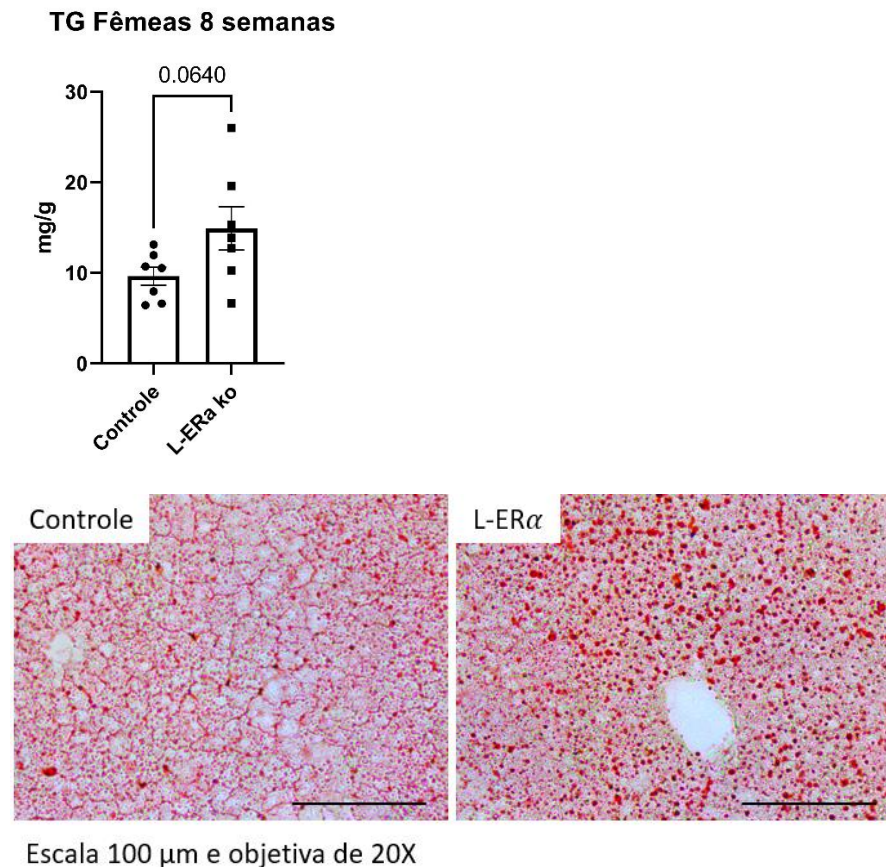


Figura 16: Acúmulo hepático de triglicerídeos. Fêmeas, 8 semanas de dieta. imagem histológica de fígado corada com OIL RED.

Como podemos observar (figura 16), os animais L-ER α KO demonstraram maiores concentrações de triglicerídeos hepáticos e também maiores e mais numerosas gotículas de lipídeos. Resultado semelhante com o obtido em 4 semanas de dieta, porém, com o aumento do tempo de dieta, os animais controle também obtiveram um acúmulo maior de lipídeos, o que já era esperado.

4.10 Resistência hepática a insulina.

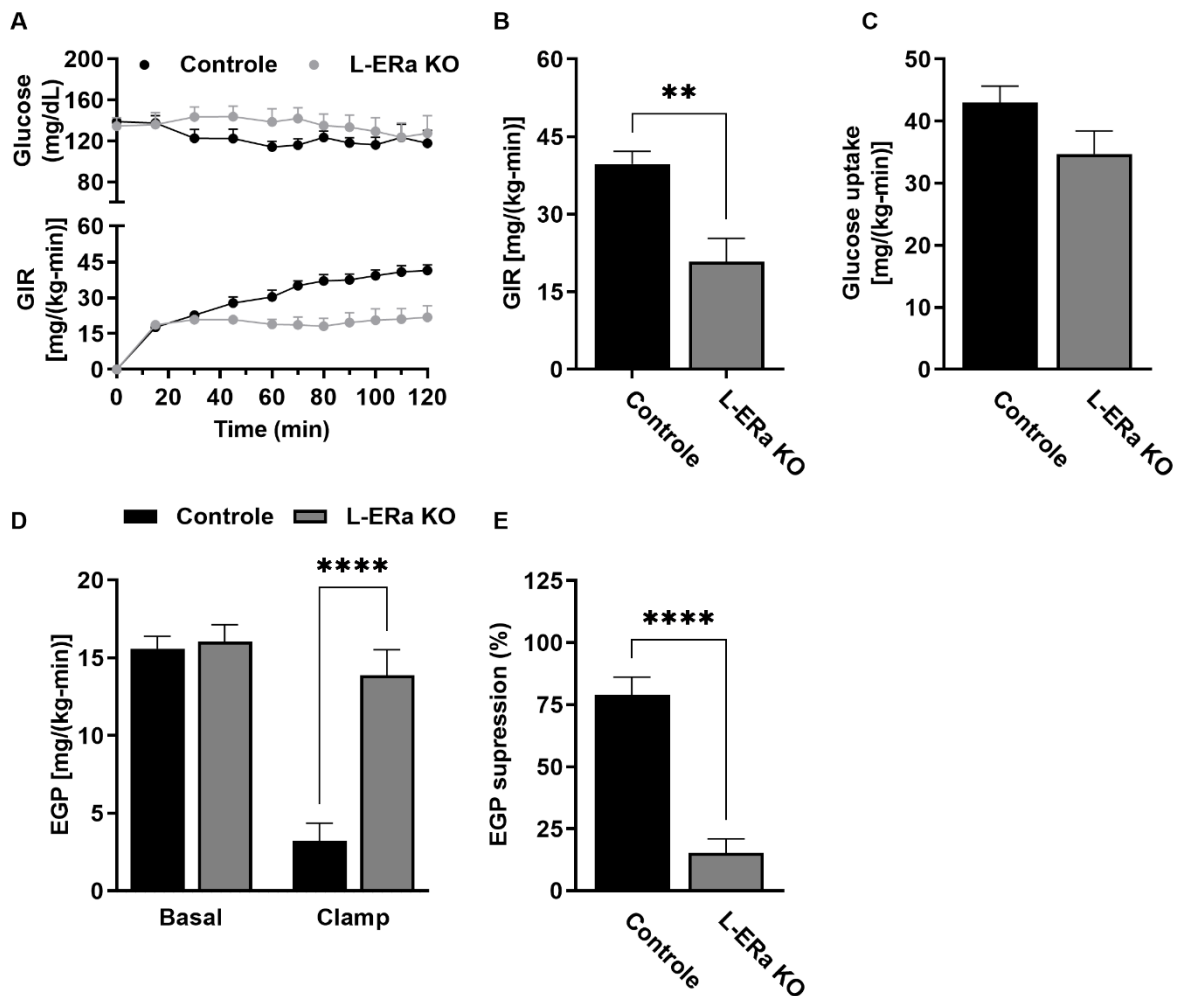


Figura 17: (A) Curva glicêmica e Taxa de infusão de glicose. (B) Taxa média de infusão de glicose durante os últimos 40 minutos de clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. (C) Captação de glicose corporal total estimulada por insulina durante o clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. (D) Produção endógena basal de glicose. (E) Supressão da produção de glicose endógena estimulada por insulina durante o clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico.

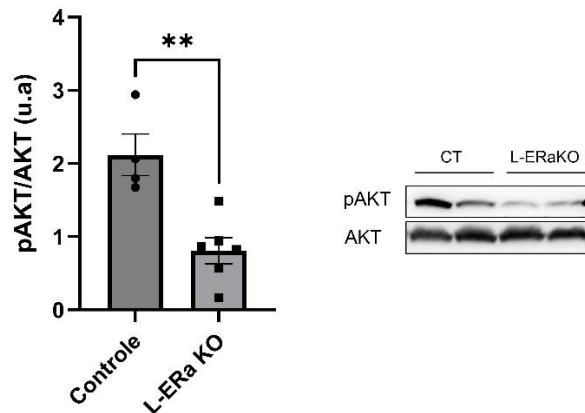


Figura 17: Avaliação da fosforilação de AKT no fígado

Para este experimento foram utilizados somente camundongos fêmeas, alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica. Como podemos observar, os animais L-ER α KO demonstraram uma diminuição significativa na supressão da produção de glicose endógena estimulada por insulina, corroborando com o a expressão gênica e proteica de PEPCK, como demonstrado anteriormente. Além disso, foi necessária uma menor taxa de infusão de glicose durante o experimento para a manutenção dos valores glicêmicos do animais L-ER α KO. Podemos observar que também, estes animais tiveram uma menor fosforilação da proteína AKT, principal responsável pela ativação e inibição de diferentes vias reguladas pela insulina como discutido anteriormente.

Esses resultados corroboram com o estudo elaborado por Camporez et. al em 2013, onde animais ovariectomizados demonstraram uma diminuição significativa da supressão da produção de glicose endógena estimulada por insulina e uma menor taxa de infusão de glicose durante o experimento. Porém, animais ovariectomizados que receberam a reposição de estradiol demonstraram uma melhora significativa sobre esses mesmos parâmetros, além de melhora na captação de glicose por outros tecidos além do fígado (Camporez. 2013.). Outro estudo também demonstrou os impactos da ausência global do ER α sobre o metabolismo, animais com a modulação knockout do ER α demonstraram uma redução da captação de 2-deoxyglucose no tecido muscular esquelético de camundongos fêmeas (Bryzgalova, G. 2006). Com esses resultados, podemos demonstrar o quão importante é a ação do ER α hepático sobre o metabolismo glicêmico, sendo parte essencial da manutenção da glicemia principalmente através da ação da insulina sobre o tecido hepático.

5 Conclusão

Concluimos que o ER α possui papel fundamental na regulação lipídica e glicêmica, sendo parte essencial de diversos mecanismos de regulação da gliconeogênese, exportação de VLDL, síntese de lipídeos e sensibilidade à insulina em machos e fêmeas. Sendo assim, agonistas deste receptor podem ser excelentes contribuidores para novos tratamentos para DHGNA e DM2.

6. Referencias.

- Koulouri, O.; Ostberg, J.; Conway, G.S. Liver dysfunction in Turner's syndrome: Prevalence, natural history and effect of exogenous oestrogen. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2008, 69, 306–310.
- Ascha, M.S.; Hanouneh, I.A.; Lopez, R.; Tamimi, T.A.; Feldstein, A.F.; Zein, N.N. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010, 51, 1972–1978.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Millar, J.S., Cromley, D.A., McCoy, M.G., Rader, D.J., and Billheimer, J.T. (2005). Determining hepatic triglyceride production in mice: comparison of poloxamer 407 with Triton WR-1339. *Journal of lipid research* 46, 2023-2028.
- Camporez, J.P., Jornayvaz, F.R., Lee, H.Y., Kanda, S., Guigni, B.A., Kahn, M., Samuel, V.T., Carvalho, C.R., Petersen, K.F., Jurczak, M.J., et al. (2013). Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. *Endocrinology* 154, 1021-1028.
- Ayala, J.E., Samuel, V.T., Morton, G.J., Obici, S., Croniger, C.M., Shulman, G.I., Wasserman, D.H., McGuinness, O.P., and Consortium, N.I.H.M.M.P.C. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease models & mechanisms* 3, 525-534.
- Lyu et al., 2020, *Cell Metabolism* 32, 654–664 October 6, 2020, ^a 2020 Elsevier Inc.
- Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 2018 Oct 1;98(4):2133-2223. doi: 10.1152/physrev.00063.2017. PMID: 30067154; PMCID: PMC6170977.
- Chavez JA, Summers SA. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab.* 2012 May 2;15(5):585-94. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.002. PMID: 22560211.
- Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, Still CD, Gerhard GS, Han X, Dziura J, Petersen KF, Samuel VT, Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Sep 27;108(39):16381-5. doi: 10.1073/pnas.1113359108. Epub 2011 Sep 19. PMID: 21930939; PMCID: PMC3182681.

- Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 2003; 124: 71– 79.
- Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010; 51: 679- 689.
- Younossi, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73–84 (2016).
- Huang, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* 2, 231–237 (2009).
- Lindenmeyer, C. C. & McCullough, A. J. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease—an evolving view. *Clin. Liver Dis.* 22, 11–21 (2018).
- Ballestri, S. et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 31, 936–944 (2016)
- Choudhury, J. & Sanyal, A. J. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Liver Dis.* 8, 575–594 (2004). ix.
- Misra, A. et al. Consensus statement for diagnosis of obesity, abdominal obesity and the metabolic syndrome for Asian Indians and recommendations for physical activity, medical and surgical management. *J. Assoc. Physicians India* 57, 163–170 (2009).
- Romeo, S. et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* 40, 1461–1465 (2008).
- Petersen, K. F. et al. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 1082–1089 (2010).
- Lomonaco, R. et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 55, 1389–1397 (2012).
- Donnelly, K. L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 115, 1343–1351 (2005).

- Schwarz, J. M. et al. Effects of dietary fructose restriction on liver fat, de novo lipogenesis, and insulin kinetics in children with obesity. *Gastroenterology* 153, 743–752 (2017).
- Sofic, S., Cohen, D. E. & Kahn, C. R. Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. *Dig. Dis. Sci.* 61, 1282–1293 (2016).
- Bril, F. et al. Metabolic and histological implications of intrahepatic triglyceride content in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 65, 1132–1144 (2017).
- Samuel, V. T. & Shulman, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* 126, 12–22 (2016).
- Yki-Järvinen, H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2, 901–910 (2014).
- Loomba, R. et al. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology* 56, 943–951 (2012).
- Sabio, G. et al. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322, 1539–1543 (2008). 102.
- Tilg, H. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis.* 28, 179–185 (2010).
- Csak, T. et al. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* 54, 133–144 (2011).
- Cho, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 138, 271–281 (2018).
- Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, Zhang R, Kelly KR, Defronzo RA, Kirwan JP. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes*. 2009 Feb;58(2):337-43. doi: 10.2337/db08-1228. Epub 2008 Nov 13. PMID: 19008343; PMCID: PMC2628606.
- Han, S.-i., Komatsu, Y., Murayama, A., Steffensen, K.R., Nakagawa, Y., Nakajima, Y., Suzuki, M., Oie, S., Parini, P., Vedin, L.-L., Kishimoto, H., Shimano, H., Gustafsson, J.-Å. and Yanagisawa, J. (2014), Estrogen receptor ligands ameliorate fatty liver through a nonclassical estrogen receptor/Liver X receptor pathway in mice. *Hepatology*, 59: 1791-1802.

- Jacob M. Haus, Sangeeta R. Kashyap, Takhar Kasumov, Renliang Zhang, Karen R. Kelly, Ralph A. DeFronzo, John P. Kirwan; Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects With Type 2 Diabetes and Correlate With the Severity of Insulin Resistance. *Diabetes* 1 February 2009; 58 (2): 337–343.

Yang, Y., Smith, D.L., Jr., Keating, K.D., Allison, D.B. and Nagy, T.R. (2014), Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice. *Obesity*, 22: 2147-2155.

Bryzgalova, G., Gao, H., Ahren, B. *et al.* Evidence that oestrogen receptor- α plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* **49**, 588–597 (2006).

-Ahmed-Sorour H, Bailey CJ (1981) Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Glycogen formation and gluconeogenesis. *Ann Nutr Metab* 25:208–212

-Borthwick EB, Houston MP, Coughtrie MW, Burchell A (2001) The antihyperglycemic effect of estrone sulfate in genetically obese-diabetic (ob/ob) mice is associated with reduced hepatic glucose-6-phosphatase. *Horm Metab Res* 33:721–726

-Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 2010;375(9733):2267–2277

- Paquette, Amélie MSc1; Wang, Donghao PhD2; Jankowski, Marek PhD2; Gutkowska, Jolanta PhD2; Lavoie, Jean-Marc PhD1. Effects of ovariectomy on PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *Menopause* 15(6):p 1169-1175, December 2008.

-Tuo, L., Xiang, J., Pan, X. et al. PCK1 negatively regulates cell cycle progression and hepatoma cell proliferation via the AMPK/p27Kip1 axis. *J Exp Clin Cancer Res* 38, 50 (2019).

- Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):5987-92.

- Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):1-9.

- Moon YA, Liang G, Xie X, et al. The SCAP/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab*. 2012;15(2):240-

6.

-Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857– 868, 1999. doi:10.1016/S0092-8674(00)80595-4

- Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA, White MF. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell Metab* 8: 65–76, 2008. doi:10.1016/j.cmet.2008. 06.006

- Lin HV, Accili D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell Metab* 14: 9 –19, 2011. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.003.

- Ueda S, Kitazawa S, Ishida K, Nishikawa Y, Matsui M, Matsumoto H, Aoki T, Nozaki S, Takeda T, Tamori Y, Aiba A, Kahn CR, Kataoka T, Satoh T. Crucial role of the small GTPase Rac1 in insulin-stimulated translocation of glucose transporter 4 to the mouse skeletal muscle sarcolemma. *FASEB J* 24: 2254 –2261, 2010. doi:10.1096/fj.09-137380

- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1 PGC-1 interaction. *Nature* 423: 550 –555, 2003. doi:10.1038/nature01667.

- Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1(Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* 108: 1359 –1367, 2001. doi:10.1172/JCI200112876.

-Barsalani, R., Chapados, N. A., & Lavoie, J.-M. (2011). Hepatic VLDL-TG Production and MTP Gene Expression are Decreased in Ovariectomized Rats: Effects of Exercise Training. *Journal of Applied Physiology*, 110(3), 655-663. doi: 10.1152/jappphysiol.01266.2010

- Camporez JPG, Kanda S, Petersen MC, Jornayvaz FR, Samuel VT, Bhanot S, Petersen KF, Jurczak MJ, Shulman GI. ApoA5 knockdown improves whole-body insulin sensitivity in high-fat-fed mice by reducing ectopic lipid content. *J Lipid Res.* 2015 Mar;56(3):526-536. doi: 10.1194/jlr.M054080. Epub 2014 Dec 29. PMID: 25548259; PMCID: PMC4340301.