

GUSTAVO APARECIDO DOS SANTOS

MODULAÇÃO DO METABOLISMO HEPÁTICO DA GLICOSE PELA ATIVAÇÃO DE VIAS INFLAMATÓRIAS: A PARTICIPAÇÃO DAS PROTEÍNAS AMPK E *TOLL LIKE RECEPTOR* (TLR4) HIPOTALÂMICAS.

CAMPINAS 2013





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Ciências Médicas

GUSTAVO APARECIDO DOS SANTOS

MODULAÇÃO DO METABOLISMO HEPÁTICO DA GLICOSE PELA ATIVAÇÃO DE VIAS INFLAMATÓRIAS: A PARTICIPAÇÃO DAS PROTEÍNAS AMPK E *TOLL LIKE RECEPTOR* (TLR4) HIPOTALÂMICAS.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO GUSTAVO APARECIDO DOS SANTOS E ORIENTADO PELO PROF. DR. MARCIO ALBERTO, TORSONI.

Orientador: Prof. Dr) Márcio Alberto Torsoni

CAMPINAS 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

Sa59m

Santos, Gustavo Aparecido dos, 1989-

Modulação do metabolismo hepático da glicose pela ativação de vias inflamatórias: a participação das proteínas AMPK e toll like receptor (TLR4) hipotalâmicas / Gustavo Aparecido dos Santos. — Campinas, SP:[s.n.], 2013.

Orientador : Marcio Alberto Torsoni. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 Proteína quinase ativada por AMP. 2. Receptor Toll like tipo 4. 3. Fígado. 4. Endotoxemia. 5.
 Hipoglicemia. I. Torsoni, Marcio Alberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Modulation of hepatic metabolism of glucose by activation of inflammatory pathway: the role of hypothalamic AMPK and toll like receptor 4 (TLR4) proteins.

Palavras-chave em inglês:

AMP-Activated Protein Kinases

Toll-like receptor 4

Liver

Endotoxemia

Hypoglycemia

Área de concentração: Clínica Médica Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Marcio Alberto Torsoni [Orientador] Dennys Esper Côrrea Cintra Leonardo dos Reis Silveira **Data da defesa:** 26-04-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

GUSTAVO APARECIDO DOS SANTOS

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARCIO ALBERTO TORSONI

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). MARCIO ALBERTO TORSONI

2. PROF(A). DR(A). DENNYS ESPER CÔRREA CINTRA

3. PROF(A). DR(A). LEONARDO DOS REIS SILVEIRA

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 26 de abril de 2013

DEDICATÓRIA

À minha família,
amigos e conselheiros,
dedico esse trabalho e agradeço
pelo incentivo e confiança em todos os momentos da minha vida.



Agradecimentos:

Agradeço inicialmente a **DEUS** por todas as coisas boas presentes na minha vida e por ter colocado no meu caminho amigos materiais e imateriais que sempre me apoiaram e me auxiliaram com conselhos e incentivos.

Agradeço a minha família em especial a minha mãe, minha irmã e ao meu pai.

A minha **mãe EVA** por ser uma mulher guerreira, maravilhosa e muito batalhadora, uma pessoa incrível que sempre fez e até hoje faz de tudo para que os seus filhos recebam uma boa educação e se tornem pessoas melhores na vida. Uma mulher cheia de vontade e coragem que apesar de ter um passado estruturado pela dificuldade, suor, exigências e pouca educação nunca deixou de buscar os seus objetivos e até hoje sempre estuda e incentiva os seus filhos a estudarem, e é por observar toda essa manifestação de força de vontade, amor e carinho aos seus filhos que eu nunca me deixei abater por quaisquer problemas. Pois a cada tropeço e a cada degrau galgado sempre tive o olhar e o incentivo de minha mãe, e é a ela que dedico essa dissertação e agradeço por ser uma parte importante da pessoa que sou hoje, pois o meu caráter e minha educação são as melhores heranças que irei carregar por toda minha vida. O meu muito obrigado mãe, eu te amo!.

Agradeço a minha **irmã Evelin Loraine** por ser essa pessoa doce e trabalhadora. Tenho orgulho de ser irmão de uma mulher de aparência frágil, mas que guarda uma grandeza enorme de espírito, obrigado pelo apoio e por ajudar a nossa Mãe enquanto eu estive ausente do convívio familiar por estar correndo atrás de um sonho.

Agradeço ao meu **pai Miguel** pela educação passada em conjunto com a minha mãe e por me ensinar valor importantes e por ter contribuído direto e indiretamente na minha formação com pessoa.

Agradeço de uma maneira especial ao meu eterno mestre, orientador, pai e amigo Marcio Alberto Torsoni, uma pessoa incrível que sempre me motivou e ensinou a gostar de ciência. Agradeço-o por sempre acreditar e ajudar-me. Obrigado Marcio por ser essa pessoa especial na minha vida, obrigado por acreditar em mim. Pois confesso que havia vezes que nem eu achava que seria capaz de chegar onde estou, obrigado por ensinar-me importantes lições não só de ciência, mas também lições da vida, respeito, dedicação, generosidade, persistência, confiança e amizade. Obrigado por orientar-me corretamente, por ser o meu mestre, meu padrinho na pesquisa e "pai adotivo" nas horas vagas. Espero ter respondido a altura todo o investimento intelectual e humano que recebi do senhor (sr.). Você é, e sempre será um espelho de pessoa e profissional que eu desejo ser. É difícil redigir a minha gratidão pelo sr., pois mesmo que eu escrevesse milhares de parágrafos e capítulos certas coisas não tem tradução e nem expressão, mas são o bastante para manter a alma em harmonia e em gratidão eterna. O meu muito obrigado por ter feito a coisa certa. Muito obrigado por ter mudado a minha história através da educação, são pessoas como o sr. que tornam este país um lugar melhor. Tenha certeza que os valores e conhecimentos adquiridos pelo sr. serão passados para os meus futuros alunos. Sou eternamente grato por tudo. Quero também agradecer pela sua compreensão, por entender-me nesse momento

de mudança, é sempre difícil mudar, sair da zona de conforto, pois são 6 anos de trabalho e amizade, mas me sinto seguro e preparado para isso. Eu estou indo fazer doutorado em outro laboratório para ter contato com outras áreas, ampliar e também complementar os conhecimentos adquiridos com o sr. Gostaria que o sr. entende-se que o termino do mestrado é só a conclusão de uma fase assim como também foi a graduação, mas o contato, amizade, respeito e a ajuda no laboratório sempre irão continuar. Eu estou encarando essa mudança de laboratório igualmente como foi a minha mudança de casa quando vim morar em Campinas. "Eu estou saindo de um local onde sei que sou querido e respeitado, para obter novos conhecimentos e ampliar a minha visão de mundo, através do contato com pessoas diferentes e com visões e conhecimentos diferentes." Para essa nova fase de mudança estou seguindo a frase "Aprenda com o melhor, então adapte_Tom Peters".

Ao Marcio Alberto Torsoni:

Mestre é aquele que caminha com o tempo, propondo paz, fazendo comunhão, despertando sabedoria.

Mestre é aquele que estende a mão, inicia o diálogo e encaminha para a aventura da vida.

Não é o que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas o que questiona e desperta para a realidade.

Não é aquele que dá de seu saber, mas aquele que faz germinar o saber do discípulo .

Mestre é você, meu professor amigo que me compreende e me estimula ao saber Eu serei sempre um discípulo na faculdade da vida.

O sr. será sempre o meu eterno amigo Marcio, OBRIGADO POR TUDO!

Agradeço a **Professora Adriana Souza Torsoni**, por ser uma mulher incrível, sou grato pelo carinho e pelos conselhos que sempre me ajudaram a tomar decisões importantes nos momentos decisivos da minha vida, muito obrigado pelo carinho materno e pela troca de conhecimento científico. Obrigado por tomar as decisões certas, pois essas decisões sempre ajudaram e ajudam todos os alunos até hoje.

Agradeço a **professora Marciane Milanski** pelas discussões cientificas, pela amizade e alegria e sorrisos e pela disposição e sempre em me ajudar quando precisei.

Agradeço ao **professor Dennys Esper Cintra** um grande amigo e mentor, obrigado por sempre motivar-me e incentivar o meu progresso científico e pessoal. Obrigado por acreditar no meu potencial, obrigado pelos conselhos, agradáveis conversas, ensinamentos de vida e grandes e produtivas discussões científicas.

Agradeço e também dedico este trabalho aos meus queridos colaboradores, **Erika Anne, Rodrigo Moura e Daniele Vitorino** pela dedicação, ajuda e elaboração desse trabalho.

Agradeço a **Erika Roman**, a minha "Big sister" a minha querida irmã mais velha carinhosamente adotada. Nesses 2 anos de aprimoramento e vivencia cientifica no mestrado a presença da Erika foi de suma importância, pois aprendi muito com ela. Pude aprender e aprimorar as minhas habilidades de organização, gestão de laboratório e cuidado e respeito com os animais

através da observação do seu excelente trabalho técnico no laboratório. Com a Erika a aprendi a respeitar ainda mais os animais, pois o cuidado e manejo com os animais eu já possuía, mas como o auxilio da Erika passei a enxerga-los não só como cobaias, mas sim como importantes seres que sedem a sua vida involuntariamente para o bem maior da sociedade e desenvolvimento da ciência. Erikinha muito obrigado por tudo, pessoas como você eu quero ter sempre perto de mim, pois elas me fazem lembrar que na pesquisa existem pessoas humildes e agradáveis e com o pensamento no bem comum a todos. Obrigado por tudo queridona e conte comigo sempre que precisar!.

Agradeço ao meu **grande amigo Rodrigo Moura** que também considero como um irmão, uma pessoa sensacional igualmente a todas as pessoas já citadas. Rodrigão obrigado por ser o meu braço direito nos experimentos assim com a Erika também foi. Obrigado pelos ensinamentos científicos e por me ensinar a analisar corretamente os meus resultados, pois sem duvida os meus resultados chegaram essa perfeição por causa da sua ajuda e dedicação. Obrigado pela disposição e companheirismo, tenha certeza que sempre iremos nos ajudar daqui pra frente, temos mais 4 anos de colaboração e risadas com sua famosas de piadas.

Agradeço a **Daniele Vitorino** pela sua ajuda e conversas cientificas, obrigado pela ajuda nos experimentos. Obrigado Dani, sem sua ajuda esse trabalho não estaria completo. Tenha certeza que eu continuarei trabalhando e contribuindo para a conclusão do seu trabalho.

Agradeço a **Arine Melo**, pela sua amizade e ajuda desde os tempos do laboratório em Mogi das Cruzes. Obrigado Arine pela alegria e companhia e por ser essa pessoa meiga e prestativa, vou sentir a sua falta, mas tenha certeza que nossa amizade irá continuar mesmo com a longa distancia.

Agradeço a **Rafaela Benatti**, pela sua amizade e pela ajuda nos resultados iniciais deste trabalho, assim com a Arine eu também vou sentir falta de você e do convívio no laboratório. Obrigado por toda ajuda.

Agradeço a **Carla Nuñez e a Angelica Sartori-Cintra** pela amizade, ajudas, conversas, conselhos nos momentos certos e bate-papo amigável. Obrigado por estarem ao meu lado e compartilharem as suas ideias.

Agradeço ao **professor Licio Velloso** por ter contribuído de maneira importante para o desenvolvimento deste trabalho, desde a contribuição de espaço, reagentes, cobaias, materiais, dentre outros fatores que contribuíram para a conclusão deste estudo, como também gostaria de agradecê-lo pelos conselhos, incentivos, elogios, agradáveis discussões cientificas e conversas amigáveis. Obrigado por acreditar no meu potencial e por me permitir a honra de ser o seu coorientado durante o doutorado junto com a orientação do excelente docente Professor Rodrigo Ramos Catharino. Tenha a certeza de que a nossa parceria irá gerar bons frutos para a ciência. Obrigado professor Licio é uma honra poder trabalhar com o sr.

Agradeço a todos(as) os(as) alunos(as) **do Laboratório de Distúrbios do metabolismo -LabiDime**/Limeira: Ana Carolina Ferras, Andressa Reginato, Fabiana Pires, Fabiana Tannihão, Fernanda Borges, Lais Simino, Mariana Portoveto, Milena Versutti, Nicole Ashino, Simone Lemes, Thais de Fante, Vinícius Pereira e todas as alunas e alunos, novos ou não que me perdoem por não ter o nome citado aqui mas que gosto e respeito igualmente por fazerem parte da família LabDime.

Agradeço a todos(as) os(as) alunos(as) e professores (as) do **Laboratório de Sinalização Celular-Labsincel:** Andressa Coope, Andrezza Kinote, Bruna Bombassaro, Carina

Solon, Daniela Razolli, Fabiana Souza, Fernando Ganzarolli, Prof. Gabriel Anhê, Gabriela Albuquerque, Gabriela Freitas, Joseane Morari, Juliana Contin, Juliana Faria, Letícia Souza, Lívia Bitencourt, Lucas Nascimento, Profa. Raquel Leal Simone Lee, Sylka Geloneze, Vívian Calegari, Vanessa Oliveira, Lorena Arantes, Rafael Pedro e todos os demais alunos.

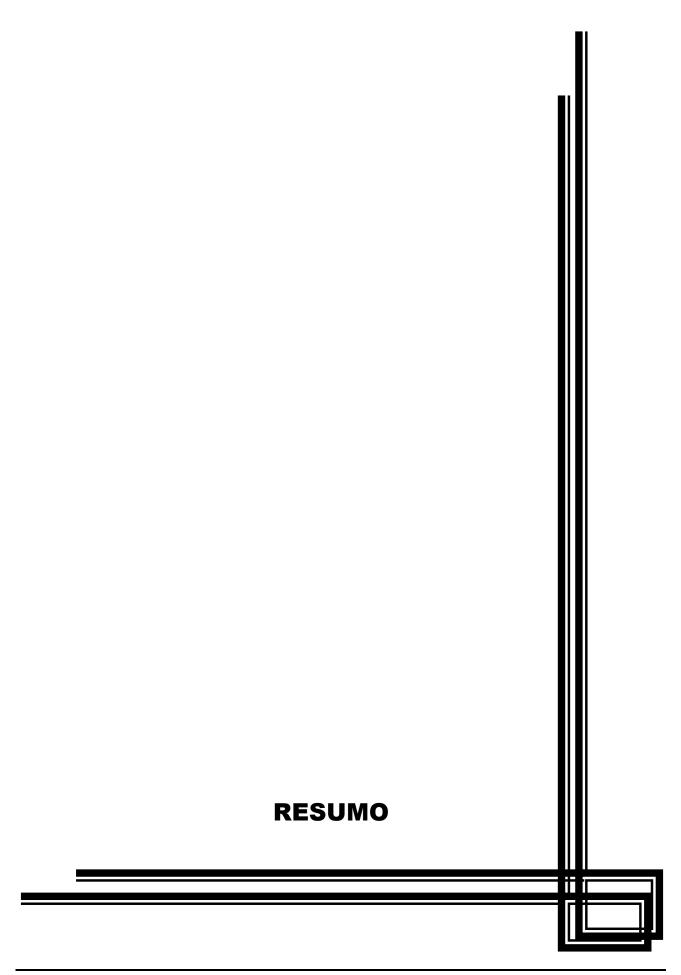
Agradeço aos técnicos do Labsincel: Erika Roman, Gerson Ferraz e Márcio Cruz, pelo suporte técnico que contribuirão para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos vocês o meu muito obrigado!!!!

Agradecimentos:

Agradeço a **Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de mestrado nº: 2010/14034-6.

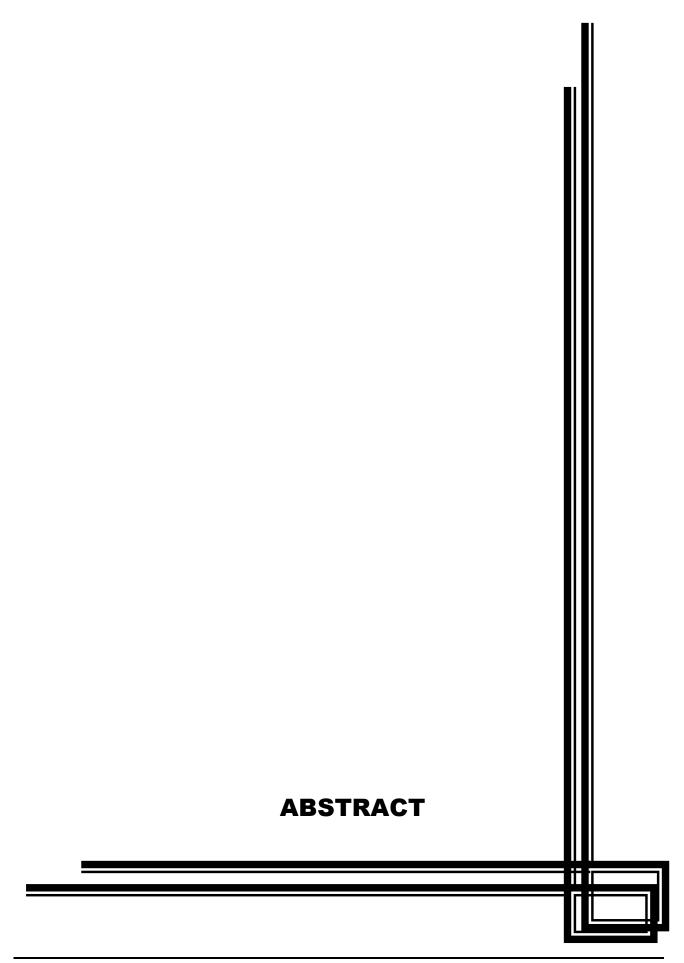
Agradeço a **Universidade estadual de Campinas (Unicamp)** pela oportunidade de contato com pessoas e culturas do mundo todo.



Resumo

A hipoglicemia endotóxica tem papel importante na sobrevivência de ratos e pacientes com sepse. O hipotálamo e uma importante área no sistema nervoso central que regula a homeostase energética. Estudos recentes têm demonstrado a importante papel da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no controle da homeostase glicêmica, sendo um importante sensor energético ativado quando a uma diminuição de disponibilidade energética como é observado na hipoglicemia, e por controlar importantes estímulos que visão reestabelecer a glicemia como a modulação da produção de glicose hepática. Até o momento não existem estudos que investiguem o papel da AMPK hipotalâmica na endotoxemia e na hipoglicemia associada a essa enfermidade. Por isso o objetivo do nosso estudo foi o de avaliar a participação das citocinas inflamatórias e da AMPK hipotalâmica na redução da resposta contrarregulatória hepática durante a endotoxemia promovida por LPS. Para isso foram utilizados camundongos (Swiss) e camundongos com mutação no receptor TLR4 (C3H/HeJ) e seus controles selvagens (Wild type (C3H/HeN)) ambos animais receberam LPS (1mg/Kg) ou salina intraperitonealmente ou/e AICAR por via intracerebroventricular e após os tempos pré-estabelecidos obtivemos os resultados que mostram que a administração periférica de LPS induz o aumento nas citocinas TNFα e ILβ, ocorreu a desfosforilação da AMPK hipotalâmica e menor fosforilação da sua proteína alvo a ACC se comparado ao grupo controle: desfosforilação da AMPK hepática e ACC hepática, aumento da fosforilação da STAT3 hipotalâmica e hepática, aumento da fosforilação a TAK1 hipotalâmica e quantidade da MyD88 hipotalâmica proteínas da via do TLR4 se comparado ao grupo controle, também foi observado aumento na fosforilação da JNK hepática, redução da ingestão alimentar, redução da glicemia basal e um possível aumento na captação de glicose observada pelo teste de tolerância à glicose nos animais que receberam LPS, também foi observado a diminuição da quantidade e expressão da proteína PEPCK e diminuição da G6Pase resultado que corroborou o resultado da diminuição da produção de glicose hepática observada no teste de tolerância ao piruvato (PTT). A redução na glicemia nos animais nos gerou uma hipótese de que esse efeito pode ter a participação da insulina onde observamos um significativo aumento nos níveis séricos deste hormônio, a ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica reduziu o efeito hipoglicemiante do LPS, onde também observamos que a ativação farmacológica da AMPK inibiu a diminuição das proteínas PEPCK e G6Pase deflagrado pelo LPS sugerindo que a um controle hipotalâmico através da AMPK sobre a secreção de glicose. Nos animais mutantes do receptor TLR4 (C3H/HeJ) não houve diminuição da glicemia e desfosforilação da AMPK hipotalâmica e diminuição da PEPCK hepática como observamos no animais Wild type (C3H/HeN). Mostrando que o receptor TLR4 possui uma atividade intrínseca na indução à hipoglicemia e desfosforilação da AMPK. Os dados do nosso trabalho mostram que a endotoxemia ocasionada pela administração de LPS exerce uma importante modulação da ação da AMPK hipotalâmica, modulação negativa da ingestão e glicemia plasmática, alem de inibir a produção de glicose e expressão e quantidades de proteínas neoglicogênicas e ativação de vias inflamatórias mostrando que a sepse e/ou endotoxemia por LPS leva a severos danos na homeostase glicêmica. contudo também mostramos que a ativação da AMPK hipotalâmica consegue minimizar os efeitos oriundos da endotoxemia, mostrando que mecanismos que atuem sobre a ativação da AMPK hipotalâmica podem contribuir para o tratamento da Sepse/endotoxemia.

Palavras chaves: AMPK, TLR4, Fígado, endotoxemia, hipoglicemia.



Abstract

Endotoxic hypoglycaemia has an important role in the survival rates of septic patients. Currently, the hypothalamus is the main area of the brain that regulates glycemic homeostasis. Previous studies have demonstrated that hypothalamic AMP-activated protein kinase (AMPK) activity is sufficient for nutrient-sensing mechanisms to modulate glucose production. However, the role of hypothalamic AMPK in hypoglycaemia associated with endotoxemia is unknown. The aims of this study were to examine hypothalamic AMPK dephosphorylation in lipopolysaccharide (LPS) treated mice and to determine whether pharmacological AMPK activation could reduce the effects of endotoxemia on the liver metabolism of glucose. Fasted Swiss mice and C3H/HeJ (TLR4-receptor mutant) and C3H/HeN (wild type) mices received intraperitoneal injections of LPS (1mg/kg). LPS-treated mice showed reduced food intake and diminished basal glycemia, increased serum TNFα and IL1β levels and hypothalamic p-TAK and TLR4/MyD88 association. These effects were accompanied by hypothalamic AMPK/ACC dephosphorylation and reduction of glucose production in the liver. Interestingly, the LPS treated mice liver also showed diminished expression of PEPCK/G6Pase and reduction in p-FOXO1, p-AMPK, p-STAT3 and p-JNK level. In contrast, the pharmacological hypothalamic AMPK activation blocked the effects of LPS on the hypothalamic AMPK phosphorylation, liver PEPCK expression and glucose production. Furthermore, the effects of LPS were TLR4-dependent because no effect on hypothalamic AMPK phosphorylation, liver PEPCK expression and basal glycemia was detected in C3H/HeJ (TLR4receptor mutant) mice. These results suggest that hypothalamic AMPK activity may be an important pharmacological target to control glucose homeostasis during endotoxemia.

Keywords: AMPK, TLR4, Liver, endotoxemia, hypoglycemia.

ACC Acetil-CoA carboxilase.

AgRP Proteína relacionada a proteína agouti.

AICAR Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide.

AKT Proteína quinase do tipo B.

AMP Adenosina monofosfato.

AMPK Proteína Quinase ativada por AMP.

AMPK α 2 Subunidade α 2 da AMPK.

ARC Núcleo Arqueado do Hipotálamo.

FOXO1 Proteina Forkhead Box 1.

G6Pase Glicose-6-Fosfatase.

IL1β Interleucina 1β.

JNK Quinase c-Jun N-terminal.

LHA Núcleo Lateral do Hipotálamo.

LPS Lipopolissacarídeos.

MCH Hormônio concentrador de melanina.

MyD88 Fator de diferenciação mielóide 88.

NF-κB Fator nuclear kappa B.

PEPCK Fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

PVN Núcleo paraventricular do hipotálamo.

STAT3 Transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3.

SNC Sistema Nervoso Central.

TAK1 Quinase ativada por fator de crescimento-β

TRH Hormônio liberador de tirotropina.

TLRs Toll like Receptors.

TLR4 Toll like Receptors tipo 4.

TNFα Fator de Necrose Tumoral.

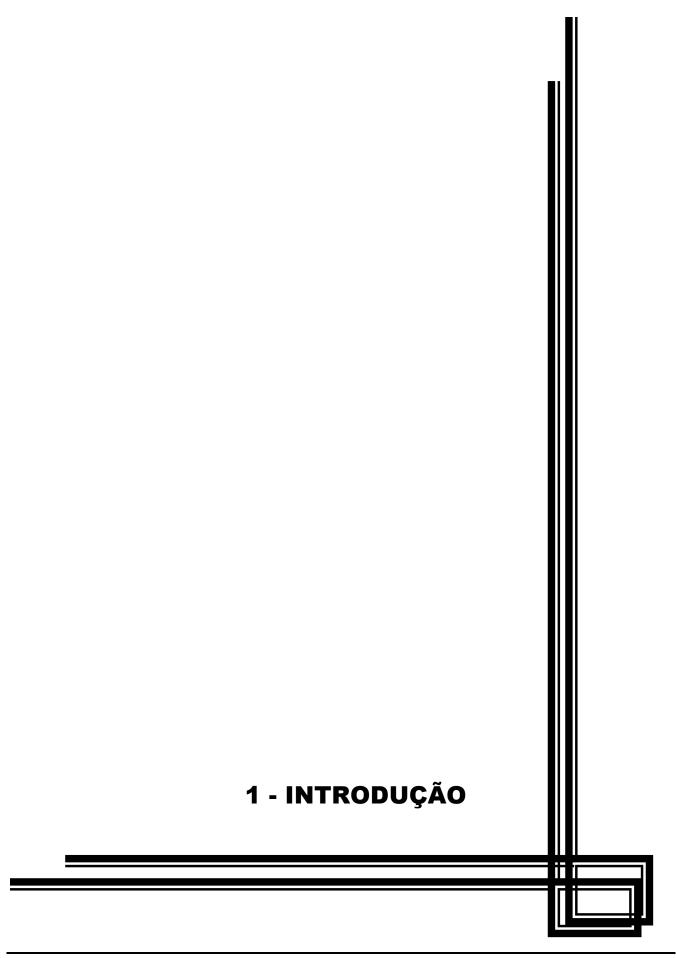
VMH Núcleo Ventromedial do Hipotálamo.

SUMÁRIO

RESUMOxiii	
ABSTRACTxv	
1. INTRODUÇÃO p20)
2. OBJETIVO p32	<u>,</u>
3. METODOLOGIA p34	ŀ
4.PROTOCOLO EXPERIMENTALp44	ŀ
7. RESULTADOS p46)
8. DISCUSSÃO p75	;
9. CONCLUSÃO p81	
10. REFERENCIAS p83	3
11. ANEXO 1: Autorização de uso animal CEUA/UNICAMPp93	}
12. ANEXO 2: Submissão do artigo científico na revista Molecular and Cellular Endocrinology	ļ

LISTA DE ILUSTAÇÕES

Figura 1	p30	
Figura 2	p44	
Figura 3	p45	
Figura 4	p47	
Figura 5	p48	
Figura 6	p49	
Figura 7	p50	
Figura 8	p51	
Figura 9	p52	
Figura 10	p53	
Figura 11	p54	
Figura 12	p55	
Figura 13	p56	
Figura 14	p57	
Figura 15	p58	
Figura 16	p59	
Figura 17	p60	
Figura 18	p61	
Figura 19	p62	
Figura 20	p63	
Figura 21	p64	
Figura 22	p65	
Figura 23	p66	
Figura 24	p67	
Figura 25	p68	
Figura 26	p69	
Figura 27	p70	
Figura 28	p71	
Figura 29	p72	
Figura 30	p73	
TABELAS		
Tabela 1	p74	



1. INTRODUÇÃO

Na última década houve surpreendente avanço no conhecimento científico a respeito dos fenômenos que participam do controle da fome e termogênese (FLER, 2004; LIVESEY, 2012). Cresce também o numero de estudos que buscam compreender a relação intrínseca entre obesidade, diabetes e os outros distúrbios metabólicos, com os processos inflamatórios e sua ação frente às importantes áreas que controlam a homeostase energética no sistema nervoso central (PENG *et al.*, 2011; RUSSO, *et al.*, 2011; TWEEDELL *et al.*, 2011; LIVESEY, 2012.).

O hipotálamo é uma importante região do sistema nervoso central (SNC) que orquestra inúmeras funções fisiológicas através da fina comunicação com amplas áreas do córtex cerebral integrando as atividades dos órgãos viscerais e o estado nutricional do organismo, sendo um dos principais responsáveis pela homeostase corporal, atuando na ativação de diversas glândulas endócrinas (VELLOSO *et al.*, 2009; TWEEDELL *et al.*, 2011; DALVI *et al.*, 2011). Esta importante região do SNC participa do controle da fome e do gasto energético através da produção de neuropeptídeos em neurônios localizados nas suas subáreas denominadas de núcleos hipotalâmicos, conhecidos como arqueado (ARC), ventromedial (VMH), paraventricular (PVH) e o lateral (LHA) (LAM, *et al.*, 2011; THOREN, 2011). Estes neuropeptídeos podem reduzir a fome e aumentar o gasto energético e são conhecidos como anorexígenos, ou então eles estimulam a fome e reduzem no gasto energético e são conhecidos como orexígenos (LEIBOWITZ e WORTLEY, 2004; DALVI *et al.*, 2011).

Embora muitos núcleos hipotalâmicos sejam importantes no controle da homeostase energética, o núcleo arqueado (ARC) é uma área chave que integra sinais hormonais e nutricionais que chegam da periferia através da barreira hematoencefálica. No núcleo arqueado existem receptores para os hormônios leptina e insulina, que através de estímulos específicos podem promover o aumento da expressão dos neuropeptídeos POMC/CART (anorexigênicos) e reduzir a expressão dos neuropeptídeos NPY/AGRP (orexigênicos), ambos nos neurônios localizados no ARC (THOREN, 2011; LEE, *et al.* 2012). Os neurônios desta região emitem projeções axonais para outras áreas do hipotálamo, tais como os núcleos periventricular e o hipotálamo lateral, que expressam a orexina, o MCH (Hormônio

concentrador de melanina) e o TRH (Hormônio liberador de tirotropina) que irão participar da resposta metabólica e comportamental frente à disponibilidade de energia e nutrientes (SCHWARTZ *et al.*, 2000; DALVI, *et al.* 2011). Interessantemente, é possível observar que a orexina, quando administrada diretamente na área hipotalâmica ventro-medial (VMH), aumenta a captação de glicose pela musculatura esquelética e este efeito é dependente da ativação de receptores β2-adrenérgicos (SHIUCHI *et al.*, 2009). O papel do hipotálamo no controle do metabolismo em tecidos periféricos é amplamente mostrado em estudos que empregam a insulina, leptina, glicose, ácidos graxos e drogas com ação farmacológica, que promovem alterações importantes no metabolismo em tecidos periféricos. Este importante aspecto da função desempenhada pelo hipotálamo no controle do metabolismo tem sido amplamente investigada e tem permitido consideráveis avanços na compreensão da neurofisiologia deste órgão, auxiliando na elucidação da interação hipotalâmica entre a dos órgãos responsáveis pela homeostase da glicose, como o fígado (LEIBOWITZ e WORTLEY, 2004; VELLOSO *et al.*, 2009; THORENS, 2011).

O tecido hepático possui papel importante nos rearranjos fisiológicos do metabolismo energético, pois participa do controle da atividade do metabolismo de carboidratos, proteínas e de ácidos graxos. É conhecido que diferentes condições metabólicas e nutricionais podem participar do controle do metabolismo hepático (LERNER et al. 2009). Em períodos pósprandiais, ocorre o aumento nos níveis séricos de glicose levando a secreção de insulina pelo pâncreas. No fígado a insulina estimula a AKT (proteína quinase do tipo B) que inativa por fosforilação a proteína GSK-3 (glicogênio sintase quinase tipo 3) e diminui a taxa de fosforilação da glicogênio sintase aumentando sua atividade e a formação de glicogênio (CARVALHEIRA, ZECCHIN e SAAD, 2002; THORENS, 2011). A insulina também induz a redução da expressão de genes neoglicogênicos, através da AKT que afeta a estabilidade do fator de transcrição FOXO1 (Proteina Forkhead Box 1), ocasionando a sua inibição e transporte para o citoplasma para ser degradado. Concomitante a esse processo ocorre a fosforilação e ativação STAT3 (transdutor de sinal e ativadores de transcrição 3) e com isso ocorre à redução da expressão de proteínas neoglicogênicas como a PEPCK e G6Pase (AGATI, YEAGLEY & QUINN, 1998; GROSS & WAN; BIRNBAUM, 2009; WANG, R. et al., 2011). Classicamente, sabe-se que a neoglicogênese é uma importante via metabólica hepática que tem papel fundamental na homeostase glicêmica, e essa via metabólica é modulada por diferentes mecanismos que envolvem desde a ação de nutrientes à ação hormonal (THORENS, 2011).

A insulina alem de controlar o metabolismo hepático, modula importantes áreas envolvidas com a homeostase glicêmica. A ação central da insulina é capaz de modular a produção de glicose pelo fígado; o bloqueio dos receptores de insulina no núcleo arqueado resulta em significante redução da capacidade da insulina circulante de inibir a produção de glicose hepática (OBICI et al., 2002; LAM et al., 2011). Estudos demonstram que o efeito da inibição da produção de glicose hepática é dependente da ativação de canais de potássio no SNC, onde ocorre a importante participação da inervação simpática e também da atuação da inervação parassimpática com a atuação do nervo vago (POCAI et al., 2005).

O SNC através da comunicação neural e entérica está em permanente comunicação com os tecidos periféricos que promovem rearranjos fisiológicos controlando a disponibilidade de nutrientes no organismo. Esse processo é muito importante, pois viabiliza e reestabelecimento da glicemia basal em períodos de hipoglicemia como é observado durante o exercício físico e o jejum (POCAI *et al.*, 2005; THORENS, 2011).

A comunicação SNC e o fígado se dá através de terminações nervosas onde a participação do nervo vago (inervação simpática e parassimpática), além da ação direta de hormônios, essa comunicação também é observada no pâncreas onde os estímulos colinérgicos providos da via parassimpática estimulam a secreção de insulina, enquanto a ação simpática de catecolaminas como a adrenalina inibe a secreção de glicose (POCAI et al., 2005; YANG et al., 2012).

A leptina, outro importante hormônio que participa da homeostase energética também pode modular a homeostase da glicose, no entanto, seu efeito sobre a produção e liberação de glicose pelo fígado esta associada a mecanismos dependentes e independentes da ativação do sistema melanocortina (GUTIERREZ-JUAREZ *et al.*, 2004; TODA *et al.*, 2009). A ação central da leptina resulta em modulação da expressão da proteína PGC1α (Receptor Y co-ativador α por proliferador de peroxissoma), inibição da AMPK (proteína quinase ativada por AMP) e ativação da AKT (ROMAN, *et al.* 2010), aumento da captação de glicose e aumento da atividade mitocondrial no tecido muscular (HAQUE *et al.*, 1999; MINOKOSHI *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2008; ROMAN *et al.*, 2010).

Desta maneira, a literatura demonstra claramente que o hipotálamo tem papel importante no controle do metabolismo através da sinalização exercida pelos hormônios e nutrientes no SNC. Entretanto, para que isso ocorra é necessária à perfeita modulação de proteínas intracelulares que participam do controle do balanço do gasto energético no hipotálamo e também no fígado. Estudos recentes colocam a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) como alvo fundamental na integração dos sinais hormonais e nutricionais que chegam ao hipotálamo e na resposta contrarregulatória coordenada por ele (MINOKOSHI et al., 2004; MORRISON, 2008; MORTON, 2007; NISWENDER e SCHWARTZ, 2003; NOGUEIRAS et al., 2008; STOPPA et al., 2008; WOODS et al., 2008).

1.1 Proteína quinase ativada por AMP (AMPK)

A Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é uma serina/treonina quinase composta por uma subunidade catalítica α e outras subunidades regulatórias β e γ (HARDIE, 2004). Cada subunidade contém isoformas codificadas por dois ou três genes: α1, α2; β1, β2; γ1, γ2, γ3 (HAN, 2005; HARDIE, 2004). A AMPK é ativada pela diminuição da concentração de ATP e por um aumento da concentração de AMP, onde o AMP se liga a subunidade γ da AMPK resultando na sua mudança estrutural e conformacional expondo o seu sitio catalítico treonina 172 da subunidade α2 favorecendo a fosforilação e ativação da AMPK pelas proteínas quinases LKB1 e CAMKK (HAN, 2005; HARDIE, 2004). Através deste mecanismo a AMPK monitora os níveis de AMP/ATP e promove à inibição de vias anabólicas e ativação das vias catabólicas nas células.

A AMPK é amplamente distribuída nos tecidos e desempenha papeis específicos em cada um deles (EVANS, 2004). No hipotálamo, a inibição da AMPK promove a redução da fome, como é observado através da administração de leptina ou glicose (CARLING, 2005, MINOKOSHI *et al.*, 2004) e sua ativação pela administração de AICAR (5-Aminoimidazone-4-carboxamide-riboside), grelina ou pelo jejum resulta em aumento da fome e da expressão de neuropeptídeos orexígenos (HAN, 2005; NAMKOONG, 2005; SEO *et al.*, 2008).

Outra importante função da AMPK hipotalâmica é a capacidade de modular a resposta contrarregulatória desencadeada pela hipoglicemia. Estudos realizados empregando um inibidor farmacológico da AMPK hipotalâmica, conhecido como composto C, ou a expressão

de um dominante negativo da AMPK, resultaram em severa e prolongada hipoglicemia induzida por insulina (HAN *et al.*, 2005). A ativação da AMPK no hipotálamo através da administração de AICAR promove maior secreção de adrenalina e glucagon em modelo animal de diabetes tipo I e animais com ausência da subunidade α2 da AMPK hipotalâmica apresentam aumento na excreção de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina), causando a inibição da secreção da insulina e reduzindo a sensibilidade à insulina no músculo (HUTCHINSONN e BENGTSSON, 2006; ROPELLE *et al.*, 2007; RUDERMAN e PRENTKI, 2004). Desta maneira, a capacidade da proteína AMPK de responder as alterações sistêmicas da disponibilidade de glicose é fundamental para a homeostase energética.

No fígado a AMPK participa do controle da produção de glicose em períodos de jejum através de estímulos catabólicos e também pela modulação de proteínas que participam do controle da neoglicogênese (LERNER *et al.* 2009; YANG, *et al.* 2010).

No tecido muscular a ativação da AMPK promove o aumento da captação de glicose de maneira independente da insulina, e no tecido adiposo branco a ativação da AMPK diminui a síntese e aumenta a oxidação dos ácidos graxos. Além disso, sua atividade está relacionada à resposta celular induzida pela hipóxia, estresse oxidativo e a presença de óxido nítrico (PARK *et al.*, 2008; TREEBAK *et al.* 2006; LANDREE, 2004; LAM *et al.*, 2003).

No hipotálamo duas proteínas expressas nos neurônios do ARC, a mTOR e a acetil-CoA carboxilase (ACC), são moduladas pela atividade da AMPK. A mTOR é inibida pela AMPK e participa do controle de processos celulares tais como, tradução, biogênese mitocondrial, autofagia e controle do metabolismo (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006). A ACC uma proteína chave para a síntese de ácidos graxos, responsável pela síntese de malonil-CoA, é inibida pela fosforilação promovida pela AMPK (LOPEZ & VIDAL-PUIG, 2008). A ACC é também é regulada por alteração covalente através da fosforilação disparada pelos hormônios glucagon e epinefrina (adrenalina) onde estes promovem a sua inibição e redução da síntese de ácidos graxos (MINOKOSHI *et al.*, 2004).

Embora o metabolismo de ácidos graxos nos neurônios não tenha finalidade de armazenamento de energia, sua atividade tem efeito direto sobre importantes mecanismos de controle da homeostase energética. A inibição farmacológica da enzima ácido graxo sintase (FAS), da AMPK, da malonil-CoA descarboxilase ou da carnitina palmitoil transferase I (CPTI), tem profundo impacto sobre a ingestão, o peso corpóreo, a produção de ácidos

graxos de cadeia longa e de glicose pelo fígado (LOPEZ *et al.*, 2008; LOPEZ e VIDAL-PUIG, 2008) além de modificar a resposta inflamatória, como observado por CHAKRAVARTHY e colaboradores (2009) em animais com inativação da expressão da FAS no hipotálamo (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2009).

Os efeitos sobre o comportamento alimentar e o metabolismo energético, atribuídos as proteínas AMPK e ACC, exigem que estas proteínas sejam moduladas de maneira muito precisa (RONNETT *et al.*, 2009). Portanto, condições que acarretam prejuízo à capacidade destas proteínas de sinalizar e promover adequada resposta metabólica podem produzir efeitos deletérios sobre a homeostase glicêmica.

Condições fisiológicas como o jejum (CHIASSON et al., 1979) e gravidez (KALHAN et al., 1988; KALHAN et al., 1991) e condições de doenças como a sepse (HOLAMN et al., 1988) são conhecidas por alterarem vários parâmetros bioquímicos e fisiológicos, entre eles a neoglicogênese hepática. O aumento da produção de glicose pelo fígado é uma característica importante da resistência hepática a insulina, desde que ela é um importante modulador negativo desta via metabólica. Desta maneira, condições que promovem a redução do sinal da insulina no fígado cursam com o aumento da glicemia de jejum, tal como observado em modelos de diabetes induzida por dieta hiperlipídica (DE SOUZA et al., 2005; ZHANG et al., 2008). Entretanto, condições que aumentam a demanda por glicose podem acarretar em hipoglicemia, como observado no quadro de sepse (HOLAMN et al., 1988; YERKOVICH et al., 2004) e câncer (ROH et al., 1984).

A Sepse ou septicemia é uma doença decorrente de infecções por bactérias, helmintos, fungos ou/e vírus, a endotoxemia é uma septicemia ocasionada por bactérias do tipo Gram-negativas (KUTTNER *et al.,* 1986; RAMADOSS, 2009). Durante a evolução do quadro de septicemia ocorre hipertermia, taquicardia, aumento das células do sistema imune, inapetência, hipoglicemia o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF α ; IL1- β ; Interleucinas como IL2, IL6 e IL8; Interferon α,β e γ (IFN- α,β,γ); Tromboxamos TXA2, leucotrienos (LTs) (Óxido Nítrico NOII) e Prostaglandinas, em conjunto ocorre o aumento do consumo de glicose por macrófagos em tecidos, tais como fígado e baço (RAMADOSS, 2009).

Estudos mostram que interleucinas envolvidas em eventos patológicos e também fisiológicos como é o caso de IL6 podem promover o aumento na captação de glicose no

músculo, promovendo a redução da disponibilidade de glicose plasmática favorecendo a hipoglicemia (MIZOCK, 1995; 2001; TWEEDELL *et al.*, 2011).

O aumento na demanda por glicose não traria danos para a homeostase se a glicemia fosse corrigida pela maior ativação e utilização de substratos neoglicogênicos pelo fígado. Contudo, na sepse um dos principais componentes de sua patofisologia é a hipoglicemia e sua letalidade é intensificada pela inibição farmacológica da neoglicogênese hepática (KUTTNER *et al.*, 1986). Muitos estudos demonstram que durante a sepse a capacidade do fígado de sintetizar glicose é significantemente reduzida (YERKOVICH *et al.*, 2004; HILL *et al.*, 1991; 1992; WALTNER-LAW *et al.*, 2000) aparentemente através da modulação da ativação e expressão de fatores de transcrição tais como STAT3 e PGC1α e pela da ação das citocinas pró-inflamatórias (CHICHELNITSKIY *et al.*, 2009; RAMADOSS, 2009). Assim podemos concluir que em condições de septicemia a resposta contrarregulatória está afetada prejudicando o controle da homeostase da glicose.

Na literatura, apesar do grande número de estudos que mostram a redução da atividade da neoglicogênese hepática durante o quadro de infecção sistêmica, não existem estudos que mostrem a relação entre o processo infeccioso e a modulação das proteínas hipotalâmicas envolvidas com a resposta contrarregulatória. Um estudo desenvolvido por ROPELLE e colaboradores (ROPELLE et al., 2007), mostrou que a ativação da proteína AMPK no hipotálamo pela administração de AICAR ou metformina, foi capaz de reduzir a anorexia induzida pelo desenvolvimento do tumor, além de aumentar a sobrevida dos animais. Em paralelo, os autores também mostraram que a ativação da AMPK no hipotálamo cursa com a redução dos níveis sistêmicos de TNFα e IL1β, assim como, a menor produção destas citocinas no hipotálamo (ROPELLE et al., 2007; SU & CHAO et al., 2007).

1.2 Receptores Toll Like.

O sistema imune inato é uma forma ancestral de discriminação dos perfis moleculares dos mamíferos, este processo defensivo é mediado através da detecção de moléculas estranhas por receptores denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos microbianos invasores (PAMPs) (JANEWAY, 1989; LEMAITRE *et al.*; 1996). Dentre os

PPRs, os receptores Toll-like (TLR) se destacam pelo seu papel central na ligação de patógenos e iniciação da resposta inflamatória (KAWAI e AKIRA, 2009). Este tipo de receptor foi primeiramente descrito em Drosophila sendo nomeado como Toll receptor, posteriormente receptores homólogos do receptor Toll, foram identificados em mamíferos e denominados como Toll-Like Receptors-(TLR) "receptores semelhantes ao Toll" (MEDZHITOV et al., 1997).

Os Toll Like Receptors (TLRs) são membros da superfamília dos receptores de interleucina-1 (IL-1R), que respondem as partículas e micro-organismos potencialmente patogênicos. Os TLRs compreendem uma família de 10 subtipos (TLR1-10) e são expressos entre vários tipos de células do sistema imune e respondem a diferentes estímulos (MUZIO et al., 2000). Entretanto, outros tipos celulares também expressam TLR, tais como neurônios, células endoteliais, hepáticas, adiposas, cardíacas e células do epitélio intestinal (KAWAI e AKIRA, 2009).

Dentre os TLRs conhecidos, os Toll-like receptor 2 e 4 vem demonstrando uma importante ligação com a interface entre a obesidade a inflamação (KAWAI e AKIRA, 2006). Os TLR2 e TLR4 são ativados pela exposição à lipopolissacarídeo (LPS) e por ácidos graxos saturados (TAKEDA & AKIRA, 2005).

O Toll-like receptor 4 muitas vezes designado como CD284 (cluster de diferenciação 284) é um receptor transmembrana composto por um domínio extracelular que contém múltiplas leucinas (LRRs), ligado à proteína MD2, e uma cauda citoplasmática contendo o domínio conservado TIR, no receptor TLR4 a o sitio CD14 especifico para o reconhecimento de LPS (KAWAI e AKIRA, 2006; OSTUNI; ZANONI; GRANUCCI, 2010). O TLR4 possui uma importante participação no reconhecimento dos ácidos graxos saturados: ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0) e ácido palmítico (C16:0), moléculas presentes em dietas ocidentais e que estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento da obesidade (TAKEDA & AKIRA, 2005; MILANSKI *et al.*, 2009).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas, cuja presença no sangue é caracterizada como quadro de endotoxemia (HANAZAKI, 2009). Alem da infecção por micro-organismos, fatores como o consumo de dieta com alto teor de ácidos graxos saturados, favorece o aumento sérico de LPS na circulação, por promover a proliferação de bactérias Gram-negativas no intestino

(CARVALHO *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2012). A presença de LPS na circulação sistêmica promove severas alterações metabólicas, como indução à hipoglicemia decorrente da inibição de proteínas neoglicogênicas (McCALLUM, 1981; MAITRA *et al.*, 1999; GILL & STERLING, 2001). O receptor TLR4 é amplamente encontrado em diversos órgãos como o tecido adiposo, fígado, baço e pâncreas e Sistema Nervoso Central (KAWAI e AKIRA, 2006). No Sistema Nervoso Central (SNC) a ação do LPS permanece controversa, pois ainda não está bem esclarecido se o LPS tem a capacidade de atravessar a Barreira hematoencefálica (BHE) e atingir o SNC, entretanto alguns estudos mostram que o LPS tem a capacidade de alterar a permeabilidade da BHE facilitando a passagem moléculas e de algumas citocinas, como o TNF-α (JAEGER, *et al.*, 2009; DOHGU *et al.*, 2011; XIAOLU *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2011).

Na via de sinalização do TLR4 ocorre à associação do com seus ligantes, onde duas vias distintas são ativadas, a via dependente MyD88 e a via dependente de TRAM/TRIF (KAWAI e AKIRA, 2009). A via da MyD88 (Fator de diferenciação mielóide 88) consiste no recrutamento da MyD88 pelo TLR4, e ativação por fosforilação da proteína intracelular IRAK (receptor associado a IL-1 quinase) de seus complexos (IRAK1/2/4), essa mobilização proteica promove a ativação e fosforilação da proteína TRAF6 (Fator associado ao receptor de TNFα) que participa da ativação da TAK1. A TAK1 (Quinase ativada por fator de crescimento-β) é ativada por fosforilação após a indução da TRAF6 juntamente com a ligação às proteínas do complexo TAB 1/2/3 e atividade intrínseca das proteínas ubiquitinas (KAWAI & AKIRA, 2006; YAMAWAKI et al., 2010). Essa sinalização promove a ativação e fosforilação dos IKKs (IkB quinase), que por sua vez fosforila e inativa o IkB (inibidor do fator nuclear kappa B), liberando o NF-κB (fator nuclear kappa B) permitindo a sua translocação do citoplasma para o núcleo onde se conecta à regiões específicas do DNA, ativando genes responsáveis pela transcrição de diversas proteínas e citocinas, entre elas as citocinas inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF-α) (Figura 1) (IWASAKI e MEDZHITOV, 2004; TAKEDA & AKIRA, 2005; KAWAI & AKIRA, 2006). Na via da TRAM/TRIF, a TRAM (Adaptador molecular relacionado à TRIF) acoplasse a TRIF (Adaptador induzido por IFNβ no dominio TIR) recrutando e ativando duas importantes proteínas, as RIP1 e TRAF3 que modulam o fator de transcrição inflamatório de IRF3 (Fator regulador interferon). A via TRAM/TRIF se integra a via do MyD88 através da similaridade de ativação da proteína TRAF6 promovendo ativação das proteínas IKKs que propaga a sinalização IκB/NFκB, como já descrito, permitindo a ativação do NF-κB e a transcrição das citocinas inflamatórias (TNFα, IL1-β, IL6) (KAWAI & AKIRA, 2006).

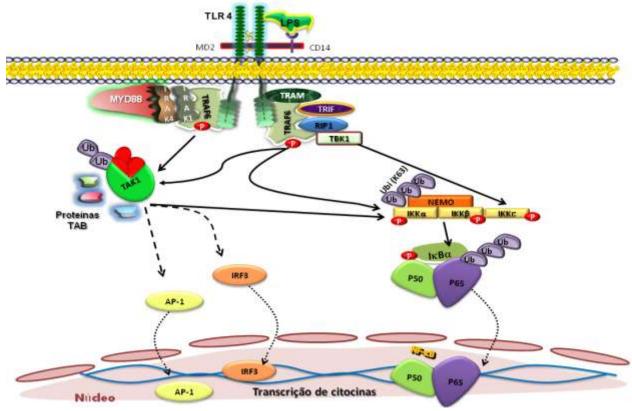


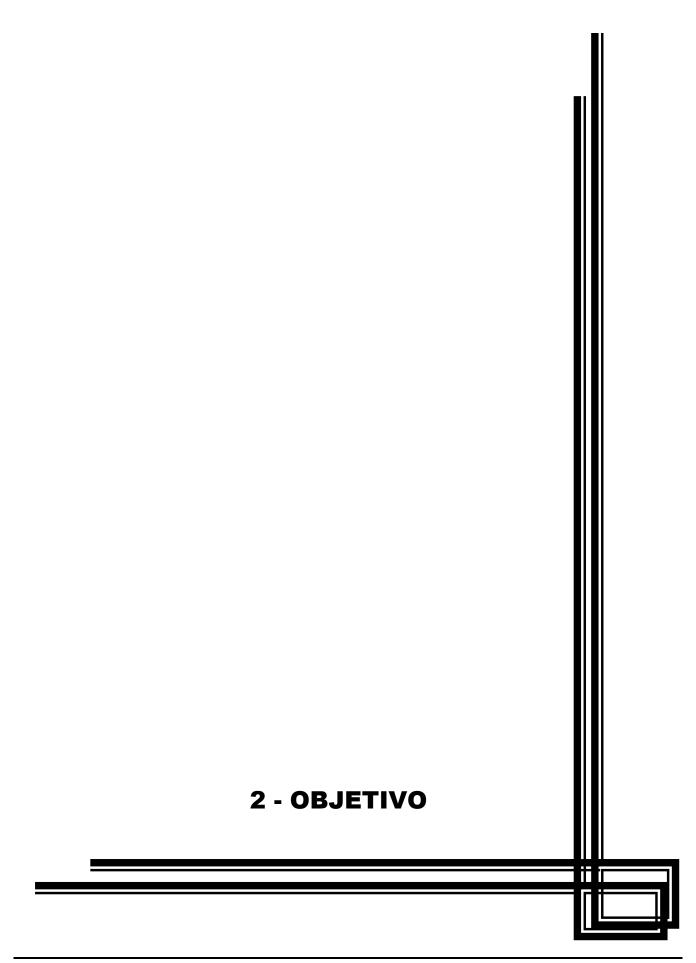
Figura 1: Via de sinalização ativada pelo TLR4 dependentes de TRAM/TRIF e MyD88 para ativação de fatores de transcrição. Figura adaptada de KAWAI e AKIRA (2006).

Após a indução do processo inflamatório as citocinas inflamatórias estabelecem sinais que são direcionados para a manutenção da inflamação (YANG *et al.*, 2001). Assim como as citocinas IL1-β e IL6 modulam a inflamação através da ligação/ativação dos seus receptores (IL6R e IL1R), o TNF-α se liga ao receptor TNFR1 (receptor 1 de TNF-α) que sinaliza e induz a ativação a proteína NFκB favorecendo o aumento da transcrição de citocinas inflamatórias como o próprio TNF-α, mantendo um mecanismo de estimulo compensatório (YANG *et al.*, 2001). Um dos principais substratos intermediários da via de sinalização inflamatória do TNF-α é a serina quinase JNK (Quinase c-Jun N-terminal) (DEMPSEY *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2013). Uma vez ativada a JNK participa da modulação de importantes via metabólicas como a inibição da via de sinalização da Insulina (LEE *et al.*, 2003). A JNK também participa da modulação da transcrição gênica de proteínas, como na inibição da transcrição da

PEPCK no fígado pela sua ação conjunta com o STAT3, evento este que contribui para o quadro de hipoglicemia observado na Sepse (YERKOVICH *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2012). Em condições inflamatórias sistêmicas como a Sepse, a capacidade que o TLR4 apresenta em induzir citocinas inflamatórias é de especial interesse para as desordens metabólicas relacionadas à obesidade e o diabetes. Entretanto pouco se sabe se os eventos inflamatórios hipotalâmicos observados na sepse pode m modular a homeostase glicêmica e resposta contrarregulatória.

Como é conhecido e foi descrito nesta introdução, tanto a obesidade como o diabetes, tem em comum a alteração dos mecanismos centrais de controle do gasto energético. Neste sentido, as vias inflamatórias tais como a ativação de TLR4 e a ação das citocinas no hipotálamo, podem ser responsáveis pela inibição da proteína AMPK neste tecido, mesmo em estado de jejum e hipoglicemia, condições que cursam com a ativação da AMPK hipotalâmica e uma eficiente resposta contrarregulatória (MUNZBERG *et al.*, 2004; SU & CHAO *et al.*, 2007; MILANSKI *et al.*,2009).

Embora os estudos que investiguem a relação entre as citocinas inflamatórias e os danos na sinalização de hormônios no hipotálamo sejam extensos, o efeito destas citocinas sobre a proteína AMPK ainda não é conhecido. Além disso, também não existem estudos na literatura que tenham explorado a relação entre a ativação de TLR4 no hipotálamo e resposta da via AMPK ao estado de hipoglicemia. Considerando a importância desta proteína na modulação da resposta contrarregulatória pelo hipotálamo, nossa hipótese foi a de que a ação central das citocinas inflamatórias e o receptor do tipo TLR4 possam desempenhar importante papel na modulação da AMPK hipotalâmica quando ocorre aumento da demanda por glicose, como é observada durante o quadro de endotoxemia. Os resultados obtidos neste trabalho são importantes para auxiliar na compreensão dessa hipótese.

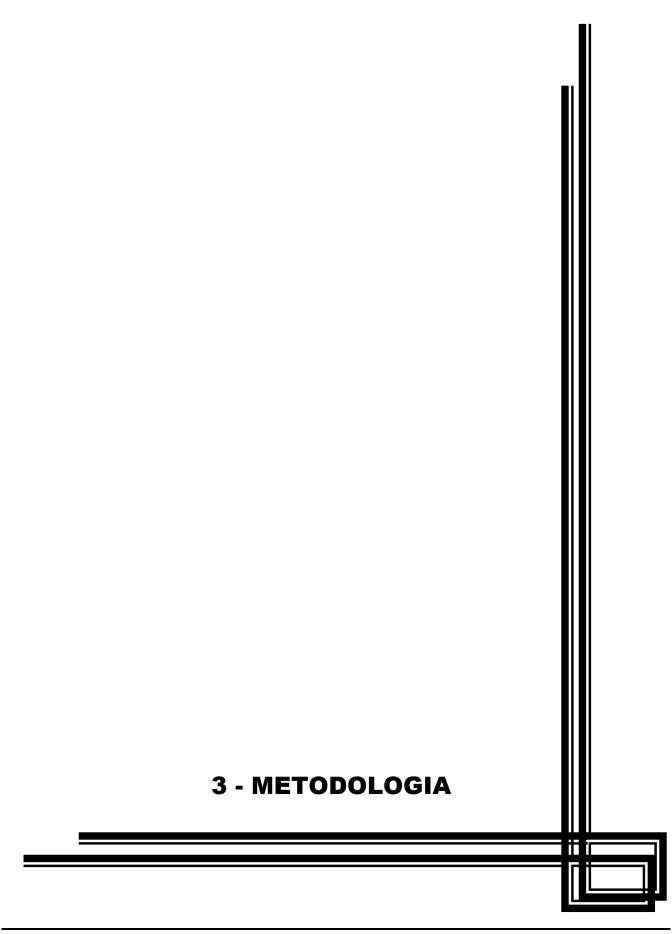


2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação de citocinas inflamatórias e da AMPK hipotalâmica na redução da resposta contrarregulatória hepática durante a endotoxemia promovida por lipopolissacarídeo (LPS).

2.1 Objetivos específicos:

- a) Avaliar o efeito do tratamento com LPS sobre a ativação das proteínas AMPK e ACC no hipotálamo;
- b) Avaliar o efeito do tratamento com LPS na produção de glicose pelo fígado e expressão de enzimas neoglicogênicas (PEPCK e G6Pase);
- c) Avaliar o efeito da ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica na glicemia e na expressão de enzimas neoglicogênicas (PEPCK e G6Pase) em animais tratados com LPS;
- d) Avaliar o efeito do tratamento com LPS sobre a AMPK hipotalâmica em animais com deficiência na sinalização do receptor TLR4.
- e) Identificar a contribuição da ação central do TLR4 para o desenvolvimento da hipoglicemia e modulação da AMPK hipotalâmica durante a endotoxemia.



3. METODOLOGIA

3.1 Animais:

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* (machos) da linhagem *Swiss*; Camundongos machos C3H/HeJ (animais com mutação no receptor TLR4) e camundongos C3H/HeN (controles selvagens). Os animais foram cedidos pelo Biotério (CEMIB da universidade estadual de Campinas (Unicamp), com aproximadamente 6 semanas de idade. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de sinalização celular (*biotério regulamentado de acordo com a legislação especifica*), com acesso a ração padrão de roedores (Nuvilab CR1) e água *ad libitum*. Durante o período de tratamento os animais foram mantidos no biotério em gaiolas individuais com acesso a água e ração *ad libitum* e ciclo de luz (claro/escuro) de 12 horas. O jejum, quando necessário, foi realizado no período noturno. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP (protocolo nº 2517-1).

3.2 Grupos experimentais:

Os animais foram separados e classificados em grupos:

- *Grupo Controle:* animais sadios que receberam salina (0,9%) via intraperitoneal (IP).
- *Grupo LPS*: animais tratados com lipopolissacarídeo (LPS) via intraperitoneal (1mg/Kg) de acordo com o protocolo adotado (figura 2).
- **Grupo AICAR + LPS**: animais tratados com lipopolissacarídeo (LPS) via intraperitoneal (1mg/Kg) e AICAR 2 mmol intracerebroventricular (ICV) 2xdia/ durante 1 dia de acordo com o protocolo adotado (figura 3).

3.3 Substâncias utilizadas no experimento:

3.3.1 lipopolissacarídeo (LPS).

O tratamento dos animais foi realizado com lipopolissacarídeo (LPS) (*Escherichia coli* O111:B4 - L2630 Sigma: 1 mg/Kg diluído em salina 0,9%), foi realizado por via intraperitoneal (IP) em animais em Jejum de 14 horas ou/e animais alimentados *ad libitum*. O tempo de

tratamento foi avaliado a partir do monitoramento da glicemia. Posteriormente outros métodos foram incorporados como analise da sinalização proteica e Real Time. Para a maioria dos protocolos as análises foram realizadas 4 horas pós a administração do LPS.

3.3.2 AICAR (Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide).

O AlCAR foi empregado no experimento através de administração intracerebroventricular (ICV) 2 vezes durante 1 dia com AlCAR 2 mmol/ μ L (3 μ L em solução salina 0,9%).

3.4 Anestesia:

Para a realização dos experimentos, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de quetamina de sódio (0,1 g/Kg), xilazina (15 mg/Kg) e diazepam (9 mg/Kg) por via intraperitoneal. Para certificar o efeito do anestésico foi avaliado o reflexo pedal dos animais. Os parâmetros utilizados para manuseio animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP (nº 2517-1).

3.5 Controle de Ingestão:

Os animais foram previamente adaptados à gaiola metabólica e posteriormente separados em grupos LPS (1mg/Kg) e CONTROLE de acordo com o protocolo experimental. O monitoramento da ingestão foi realizado no período noturno (durante 14 horas) em ambos os grupos com livre acesso a ração ou jejum de acordo com interesse.

- LPS: o LPS (1 mg/Kg) foi administrado via intraperitoneal 4 horas antes das avaliações;
- CONTROLE: a solução salina (0,9%) foi administrada via intraperitoneal no mesmo momento em que o LPS foi administrado no grupo LPS.

3.6 Teste de tolerância à glicose (GTTip):

Para avaliar a tolerância à glicose foram utilizados animais separados em grupos LPS (LPS 1 mg/Kg intraperitoneal) e CONTROLE (salina intraperitoneal) eles foram mantidos em jejum prévio de 14 horas (noturno). O teste foi iniciado 4 horas após a administração do LPS. O sangue foi coletado a partir de um corte na cauda e a medida dos níveis de glicose foi

realizado com aparelho Accu Check (Roche). Após a determinação da glicemia basal, uma solução de glicose 25 % (1g/kg) foi administrada por via intraperitoneal e novas medições de glicemia foram aferidas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos. Durante todo experimento os animais permaneceram conscientes.

3.7 Teste de Tolerância a o Piruvato Intraperitoneal (PTTip):

A tolerância ao piruvato foi avaliada em animais separados em grupos (LPS e controle) que foram mantidos em jejum prévio de 14 horas (noturno). O sangue foi obtido através de uma pequena incisão na cauda. A glicemia foi monitorada imediatamente, através de glicosímetro Accu Check (Bayer), depois da administração intraperitonial (ip) de piruvato (15% p/v) (2mg/Kg de peso corpóreo). As amostras de sangue foram coletadas para medições dos tempos 0 e 30 minutos, em animais tratados com LPS e animais controle.

3.8 Cirurgia Estereotáxica:

Os animais foram anestesiados com uma mistura de guetamina de sódio (0,1g/Kg), xilazina (15 mg/Kg) e diazepam (9 mg/Kg) por via intraperitoneal os reflexos pedal e corneal foram utilizados como controle da anestesia. Após a anestesia foi realizada a tricotomia e assepsia do crânio do animal e este foi fixado e posicionado adequadamente no fixador estereotáxico (Stoelting®), então foi realizada uma incisão inter-parietal de aproximadamente 1,5 cm, a seguir o periósteo foi divulsionado e a calota craniana exposta para a localização do Bregma, o qual é considerado o marco zero para o posicionamento da cânula, as coordenadas do ventrículo lateral foram obtidas no Atlas de Coordenadas estereotáxicas (Paximos e Watson, 1986) (antero-posterior: 0,34 mm; lateral: 1,0 mm e dorso-ventral: 2,2 mm em relação ao bregma). Após a implantação da cânula no ventrículo lateral do animal, a cânula foi fixada no crânio com cimento acrílico polimerizante (Michelotto et al., 2002). Logo após a cirurgia, cada animal recebeu paracetamol (300 mg/Kg) e após um período mínimo de 5 dias para recuperação foi realizado o teste de localização e posicionamento da cânula através da administração de 3 nmoles de angiotensina II (50 ng) (Calbiochem[®]) pela cânula com o auxilio de uma microsseringa (Hamilton®) e foi avaliada a ingestão de água (pelo menos 2 ml) em um período de 15 minutos (efeito dipsogênico).

3.9 Procedimento de extração de tecidos para análise pelo método de *Western Blot:*

Para análise da sinalização celular nos tecidos dos animais, estes foram submetidos a jejum noturno de 14 horas e foram separados em grupos de acordo com cada protocolos experimental. Os animais foram anestesiados com 180µl de tiopental sódico (50 mg/Kg) por via intraperitoneal, após a anestesia os animais foram decapitados e o peritônio dos animais foi aberto expondo as vísceras e fragmentos do tecido hepático e hipotalâmico foi retirado. Imediatamente depois de extraído, o fragmento de tecido foi homogeneizado com o auxilio do homogeneizador Politron® na velocidade de 25000 rotação por minuto (rpm), por aproximadamente 20 segundos, em tampão para imunopreciptado composto por 1% de Triton X 100, 100mM de Tris-HCI (pH 7,5), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio (NaF), 10mM de ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA), 10mM de ortovanadato de sódio (Na3VO4), 2mM de fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) e 0,1 mg/mL de aprotinina. Depois de homogeneizado o extrato foi centrifugado a 11000 RPM, por 30 minutos a 4ºC, para a remoção do material insolúvel, e somente o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste (5-10 µL) foi utilizado para dosagem do conteúdo proteico total pelo método colorimétrico de Biureto e parte foi estocada (200 µL junto com tampão *Laemmli* 100 mmol/l de DDT em Biofreezer a -86 °C para ensaios posteriores.

3.10 Western Blot:

As amostras estocadas foram aquecidas a 90 °C por 2 minutos e aplicadas (100 μg de proteínas totais) em gel de poliacrilamida na concentração de 6,5% ou 12%, de acordo com o peso molecular da proteína de interesse. A eletroforese foi realizada em aparelho BIO RAD com a voltagem elevando-se gradualmente de 30 a 120V durante a corrida. Após a eletroforese, o material contido no gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, com auxílio de um sistema de transferência da BIO RAD a 120V durante 120 minutos. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com uma solução de leite em pó desnatado Molico[®] a 5% em solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 0,02% Tween 20) durante 18 horas, com agitação leve e constante.

A detecção das proteínas na membrana foi realizada através de reação com anticorpo específico. Para isso, as membranas foram incubadas durante 12 horas (4 °C) em 10 mL de

solução de anticorpo contendo albumina 3% em solução basal. Após a incubação com os anticorpos de interesse as membranas foram lavadas com a solução basal (6 vezes durante 5 minutos).

O anticorpo secundário conjugado com peroxidase foi preparado com solução basal contendo leite em pó desnatado Molico[®] a 3%. O anticorpo secundário foi utilizado de acordo com a diluição sugerida pelo fabricante. As membranas foram incubadas com esta solução durante 2 horas à temperatura ambiente e com agitação constante. Após este processo, as membranas foram novamente lavadas com a solução basal (6 vezes durante 5 minutos) e incubadas com luminol (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate System - Pierce Biotechnology[®]), o sinal foi detectado pela exposição das membrana ao filme de raio X Kodak[®] ou aparelho espectrofotômetro (Syngene-G:Box[®]). Após a revelação do filme e/ou obtenção das imagens (espectrofotômetro) foi realizada a analise de densitometria óptica dos bandamentos, os quais representavam as proteínas de interesse, com o auxilio do programa Scion Image[®] (Scion Corporation[®]).

3.11 Imunoprecipitação:

O fragmento do hipotálamo foi homogeneizado em tampão de imunoprecipitação contendo 1% Triton X 100, 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM ortovanadato de sódio, 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C. O homogeneizado foi então centrifugado e o sobrenadante utilizado em experimentos de imunoprecipitação utilizando-se anticorpos específicos para os antígenos a serem estudados. Após incubação, imunocomplexos foram captados com proteína A Sepharose e decantados por centrifugação. Os imunocomplexos acoplados a proteína A Sepharose foram ressuspensos em tampão de Laemmli e após rápida fervura, aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). Proteínas separadas em SDS-PAGE foram então transferidas para membrana de nitrocelulose e os resultados avaliados através do western blotting com anticorpo específico. O sinal foi detectado por quimiluminescência com kit AbFrontier- West Save e posterior exposição a um aparelho fododocumentador Syngene-G:Box.

3.12 Materiais para detecção das proteínas: Foram utilizados anticorpos obtidos das empresas C*ell Signaling Technology*[®] *e Santa Cruz Biotechnology*[®]. O sistema para detecção por quimioluminescência foi adquirido da Pierce Biotechnology[®].

Anticorpos:

Cell Signaling Technology[®] Santa Cruz Biotechnology[®]

AMPK (#2603) p-AMPK (#2535) ACC(#3676) p-ACC (#3661) p-ACC (#3661) FOXO1 (#9454) p-FOXO1/2/3 (#2599)

PEPCK (sc-32879) G6Pase (sc-25840) JNK (sc-571) p-JNK (sc-6254) TRL4 (sc-10741) TAK1 (sc-292804) p-TAK1 (sc-130219) STAT3 (sc-408) p-STAT3 (sc-8001-R) B-Actina (sc-47778) MyD88 (sc-11356)

3.13 Análises por RT – PCR:

Extração de RNA do Fígado – Após os tratamentos, um fragmento do fígado de cada animal foi extraído, segundo o método de extração de tecidos, foram mantidos em condições livres de RNAses, submersas em N2 líquido para congelamento e armazenadas em biofreezer (- 80 °C) para posterior extração de RNA. Posteriormente o material foi homogeneizado com politron em 1 mL de reagente Trizol (Invitrogen Corporation, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante (sob condições estéreis e livres de RNAses).

As amostras foram transferidas para tubos novos, onde o RNA foi precipitado através de incubação por 10 minutos, à temperatura ambiente, com 0,5 mL de isopropanol, seguida de centrifugação a 12.000g, por 10 minutos, a 4 °C. Para lavar o RNA, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de etanol 75 % e a amostra centrifugada a 7.500 g, por 5 minutos, a 4 °C. O RNA foi eluído em 50 µL de água RNAse-free e quantificado em espectrofotômetro a 260 nm.

A quantidade de RNA das amostras foi estimada por espectrofotometria a 260 nm

(A260) e a 280 nm (A280), e a integridade do RNA isolado foi determinada pela razão A260:A280 e por eletroforese em gel de agarose (1,5 %) com visualização em luz ultravioleta, usando brometo de etídio como corante.

Para a produção do cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), sendo a concentração final do cDNA de 3,0 ng. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene.

3.14 PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR:

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqManTM (*Applied Biosystems*), que é constituído por um par de oligonucleotídeos e uma sonda marcada com um fluoróforo. Foram utilizadas as seguintes análises:

- Gene G6pc3 (G6Pase): análise Mm00839363_m1 (Applied Biosystems).
- Gene PCK (*Pepck*): análise Mm01247058_m1 (Applied Biosystems).

O gene Mouse ACTB (βactin) (TaqManTM - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda ACTB está marcada com o fluoróforo VIC.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, foi feita a validação do sistema para os genes acima e para o controle endógeno (ACTB), a fim de se verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes foram semelhantes e próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse. A validação consiste na amplificação, tanto com os oligonucleotídeos do gene de interesse quanto do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 3 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logarítmo da concentração das amostras pelo Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente). Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência de

um sistema é calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)}$ -1. Para a placa de validação dos genes foram feitas triplicatas da amostra de cDNA de fígado referentes aos tratamentos citados acima em 7 concentrações diferentes.

Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual teve por finalidade definir qual era a amplitude de concentrações para as quais o sistema era eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possuía uma equação de reta na qual era possível verificar o valor da inclinação desta reta. Para que o sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiveram mais próximos à linha de tendência foram considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25 μL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625 μL da solução de oligonucleotídeo e sonda, 1,625 μL de água e 4,0 μL de cDNA, sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 μL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (*Applied Biosystems*[®]).

3.15 Medidas Bioquímicas:

Para as medidas de glicose plasmática, amostras de sangue foram obtidas da cauda dos animais. O plasma sanguíneo foi obtido dos animais previamente anestesiados e decapitados juntamente com a extração tecidual. Para a medida da glicose plasmática foi utilizado o método da glicose oxidase e os níveis séricos de *insulina*, *glucagon e citocinas* foram determinados de acordo com as especificações do fabricante dos kits de ELISA (*Lynco Inc e DSL Inc*).

3.16 Forma de análise dos resultados:

As bandas de proteínas obtidas em Western blot foram quantificadas por densitometria digital (ScionCorp, Inc. Frederick, MD, USA). Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A análise dos resultados foi realizada empregando-se a análise de variância de uma via (ANOVA), com nível crítico igual ou menor que 0,05 com teste *a posteriori* de Tukey para comparação entre 3 ou mais grupos. Foi realizado o teste *t* de *Student* não pareado para a comparação entre 2 grupos.

4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.1 Protocolo Administração de LPS 1mg/Kg (IP).

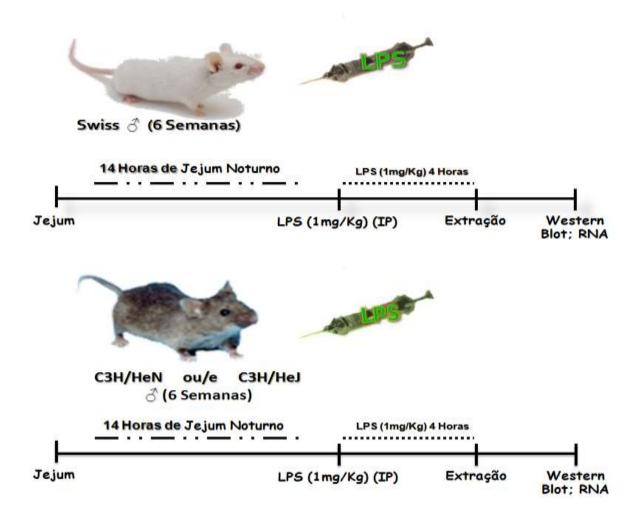


Figura 2: No protocolo do experimento: Administração de LPS 1 mg/Kg intraperitoneal (IP), foram utilizados: Camundongos *Swiss*; e em outro experimento Camundongos C3H/HeJ (animais com receptor TLR4 deficiente) e seus controles selvagem camundongos C3H/HeN, com aproximadamente 6 semanas de idade, mantidos em jejum noturno de 14 horas e separados em grupos LPS (LPS 1 mg/Kg diluído em salina 0,9% administrado via intraperitoneal) e Controle (salina 0,9% via intraperitoneal). O tempo de tratamento foi de 4 horas conforme verificado em testes prévios sobre o efeito do LPS sobre a glicemia dos animais e o diagnóstico do quadro inflamatório (Choque Séptico) (LÓPEZ-BOJÓRQUEZ *et al.*, 2004; KUTTNER *et al.*, 1986).

4.2 Protocolo Administração de LPS 1mg/Kg (IP) e Administração de AICAR (ICV).

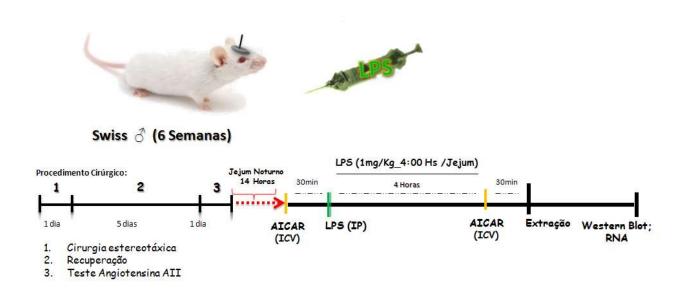
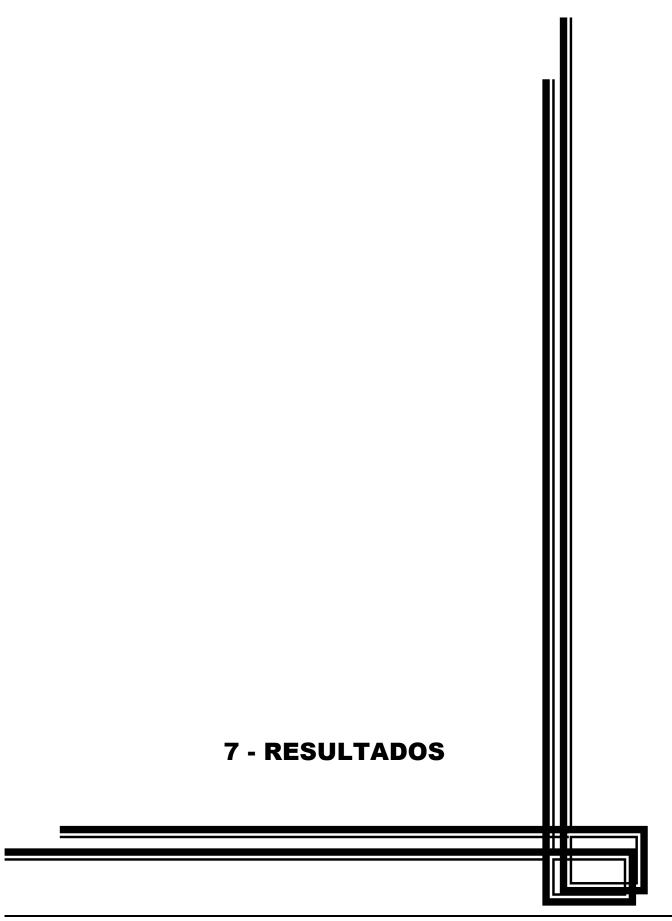


Figura 3: No protocolo do experimento: Administração de LPS 1mg/Kg (IP) e Administração de AICAR (ICV), foram utilizados animais com aproximadamente 6 semanas de idade. Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica e após a recuperação cirúrgica foi avaliada a responsividade pelo teste de angiotensina. Os animais foram mantidos em jejum noturno de 14 horas, posteriormente foram separados em grupos **Controle:** (administração de salina 0,9% via intraperitoneal); **LPS:** (LPS 1 mg/Kg diluído em salina 0,9% administrado via intraperitoneal (IP) – por 4 Horas); **AICAR:** 3 μL de AICAR (2 mmol em solução salina 0,9%) Intracerebroventricular-ICV, 2xdia / durante 1 dia; **LPS + AICAR:** LPS 1 mg/Kg (IP)/4 Horas) e AICAR (2 mmol ICV- 2xdia / durante 1 dia) (LÓPEZ-BOJÓRQUEZ *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2005).



7. RESULTADOS

7.1 Avaliação plasmática de glicose durante o tratamento com diferentes doses de lipopolissacarídeo (LPS) intraperitoneal - IP.

Como pode ser observado na figura 4 os animais tratados com LPS (IP) (1 mg/Kg) apresentaram uma redução de 40% na glicemia 4 horas após o tratamento, se comparado ao grupo controle (50 \pm 8 e 80 \pm 9 mg/Kg, respectivamente). Em doses menores (0,1 e 0,5 mg/Kg) o efeito do LPS sobre a glicemia não foi significante, embora os valores médios da glicemia tenham sido reduzidos em relação ao grupo controle.

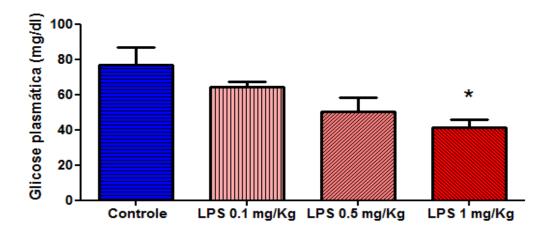


Figura 4: Glicemia de camundongos quatro horas após o tratamento com LPS (●0,1; ●0,5 e ●1 mg/Kg (via intraperitoneal - IP) (n=4) ou salina (● controle Jejum) (n=4). Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) * p<0,05 para controle jejum vs LPS 1 mg/Kg.

7.2 Avaliação da ingestão alimentar nos animais submetidos ao tratamento com lipopolissacarídeo (LPS).

O jejum prévio (24 horas), como esperado, promoveu aumento na ingestão alimentar (45%) se comparado aos animais com livre acesso a ração (controle *ad libitum*). Entretanto, a o tratamento com LPS (1 mg/Kg) reduziu significativamente (70%) da ingestão de ração embora os animais tenham sido mantido em jejum prévio (jejum 24 hs LPS).

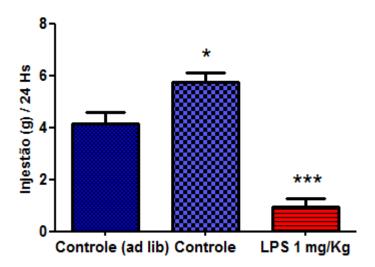


Figura 5: Ingestão noturna média de ração pelos camundongos do grupo controle alimentados (*ad libitum - ad lib*) (• n: 4); grupo controle jejum prévio de 24 horas (• n: 4); e grupo LPS (1 mg/Kg-IP) + jejum prévio de 24 horas (• n: 4). Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) *** p<0,001 para o grupo jejum 24 horas vs LPS + jejum 24 hs. * p<0,05 controle *ad Libtum vs* jejum 24 horas.

7.3 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas após a administração de lipopolissacarídeo (LPS).

Após tratamento com LPS 1 mg/kg foi verificado a concentração sérica das citocinas TNFα e IL1β. O grupo que recebeu LPS apresentou um aumento de 5,5 vezes na concentração sérica de TNFα em relação ao grupo controle (salina). Os níveis de IL1β não apresentaram diferença significativa entre os grupos LPS e Controle.

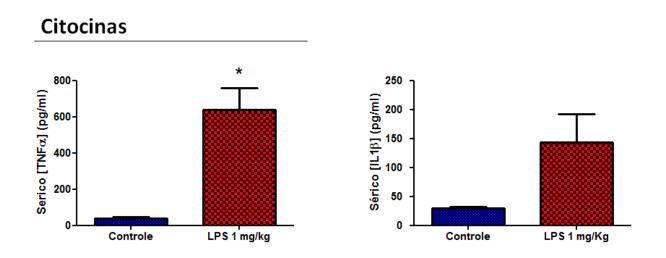


Figura 6: Dosagem de citocinas séricas nos grupos LPS 1mg/kg e grupo controle (salina). Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (•n: 5) ou salina Controle (• n: 4). Os valores representam a média ± EPM. * * p<0,01 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.4 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre fosforilação da AMPK hipotalâmica.

A quantidade total de AMPK avaliada através da normalização com a beta-actina não foi alterada pelo tratamento com LPS se comparado ao grupo controle (salina). A fosforilação da AMPK hipotalâmica avaliada por western blot após o tratamento com LPS (1 mg/Kg) foi 60% menor que a observada no grupo controle (Fig. 7).

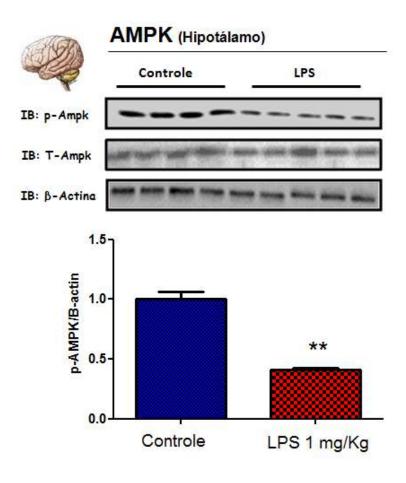


Figura 7: *Imunoblot* representativo do nível de fosforilação e quantidade da proteína AMPK hipotalâmica. A fosforilação da AMPK foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) ou salina Controle (• n: 4). Os valores representam a média ± EPM. * * p<0,01 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.5 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre fosforilação da ACC hipotalâmica.

A ACC é uma proteína alvo da AMPK e, desta maneira a sua fosforilação pode ser empregada como indicação da atividade da AMPK. Como pode ser observado na figura 8 os animais tratados com LPS (1 mg/Kg) não apresentaram alteração na quantidade de ACC, mas apresentaram significativa redução (70%) na fosforilação se comparado ao grupo controle (Salina).

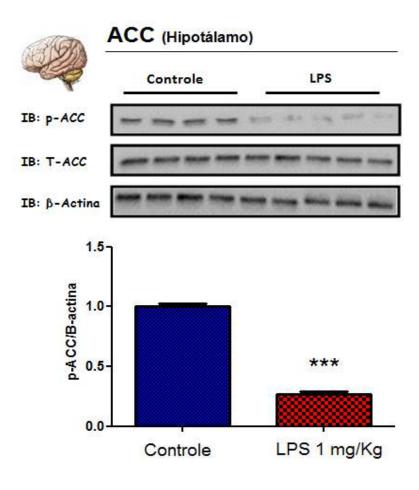


Figura 8: *Imunoblot* para avaliação da fosforilação da acetil-CoA carboxilase (p-ACC) e ACC proteína total (T-ACC) no hipotálamo dos camundongos dos grupos controle (• n: 4) e tratados com LPS-IP (1 mg/Kg-IP) (• n: 5). Os valores representam a media ± EPM, *** p<0,001 para LPS1 mg/Kg vs controle.

7.6 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre a quantidade de TLR4 hipotalâmico.

A expressão da proteína TLR4 no hipotálamo não apresentou diferença significativa entre os animais tratados com LPS (1 mg/Kg) e Grupo CONTROLE.

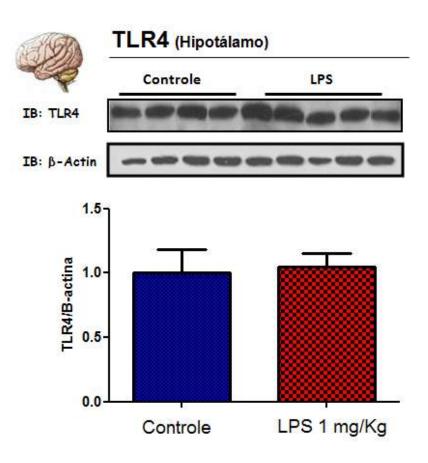


Figura 9: *Imunoblot* representativo do nível de quantidade da proteína TLR4 hipotalâmica. A quantidade da proteínaTLR4 foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) Grupo Controle (salina) (• n: 4). Os valores não representam média ± EPM. * p<0,05 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.7 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre a associação da proteína MYD88 hipotalâmica a proteína TLR4.

A MyD88 fica acoplada ao TLR4 formando o complexo proteico MyD88/TLR4, onde a quantidade de MyD88 pode ser inferida através da sua ligação ao receptor. Como pode ser observado na figura 10 os animais que receberam tratamento com LPS (1 mg/Kg), apresentaram um aumento de 48% na quantidade total da proteína MyD88 hipotalâmica se comparado ao grupo controle (Salina). Todavia não houve diferença na quantidade total do TLR4 hipotalâmico.

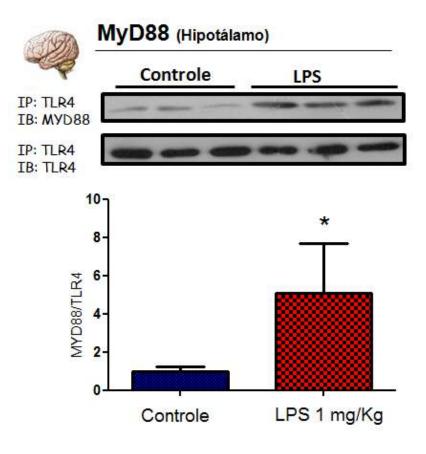


Figura 10: *Imunoblot* representativo do nível de quantidade das proteínas MYD88 eTLR4 hipotalâmica. A quantidade da proteína MYD88 foi normalizada utilizando a proteína TLR4 como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 3) e Grupo Controle (salina) (• n: 3). Os valores representam a média ± EPM. * p<0,05 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.8 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre fosforilação da TAK1 hipotalâmica.

A TAK1 é uma proteína que participa da via de sinalização do TLR4, avaliamos a sua atividade após o estimulo com LPS. Os animais tratados com LPS (1 mg/Kg) apresentam um aumento de 26% na fosforilação da TAK1 hipotalâmica se comparado com o grupo controle. A quantidade total de TAK1 avaliada através da normalização com a beta-actina não foi alterada pelo tratamento com LPS se comparado ao controle (salina) (Fig. 11).

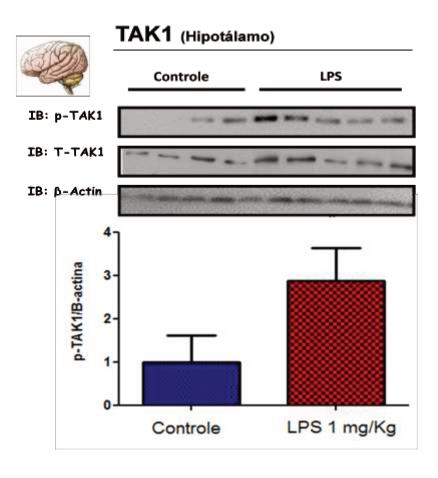


Figura 11: *Imunoblot* representativo do nível de fosforilação e quantidade da proteína TAK1 hipotalâmica. A fosforilação da TAK1 foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) e grupo Controle (salina) (• n: 4). Os valores representam a média ± EPM. * p<0,05 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.9 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre fosforilação da STAT3 hipotalâmica.

Os animais que foram tratados com LPS apresentaram um aumento de 60% na fosforilação da proteína STAT3 hipotalâmica, se comparado ao grupo controle (Salina). Todavia, o tratamento com LPS (1 mg/Kg) não modificou a quantidade total da proteína STAT3 hepática no grupo tratado.

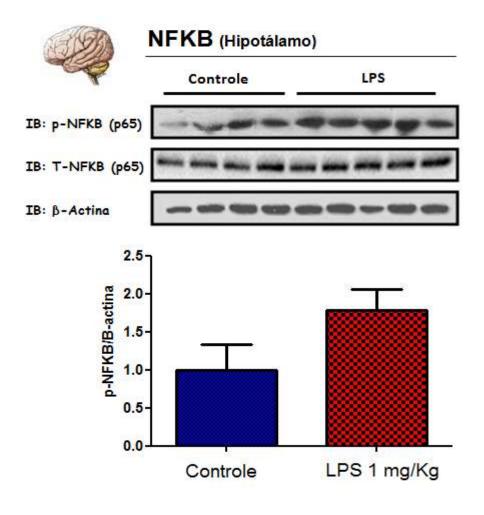


Figura 12: *Imunoblot* representativo do nível de fosforilação e quantidade da proteína STAT3 hipotalâmica. A fosforilação da STAT3 foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) e Grupo Controle (salina) (• n: 4). Os valores representam a média ± EPM. * p<0,05 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.10 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre fosforilação da NFKB Hipotalâmico.

O NFKB participa da via de sinalização do receptor TLR4, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias após translocação do citoplasma para o núcleo. O tratamento com LPS (1 mg/Kg) não modificou a fosforilação e a quantidade total da proteína NFKB hipotalâmica (citoplasmática) no grupo tratado (LPS), e não houve diferença entre os dois grupos avaliados (controle e LPS).

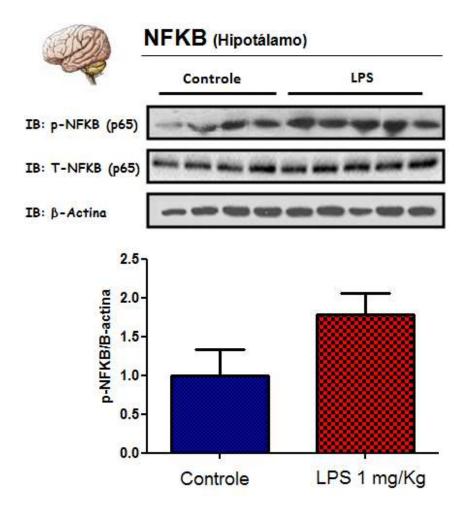


Figura 13: *Imunoblot* representativo do nível de fosforilação e quantidade da proteína NFKB hipotalâmica. A fosforilação da NFKB foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) e Grupo Controle salina) (• n: 4). Os valores não representam a média ± EPM. * p<0,05 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.11 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre fosforilação da AMPK hepática.

O grupo tratado com LPS (1 mg/Kg) não apresentou diferença na quantidade da AMPK hepática (avaliado através da normalização com a beta-actina) se comparado ao grupo controle. Por outro lado, o tratamento com LPS resultou em significativa redução da fosforilação (30%) se comparado ao grupo controle (Salina) (Fig. 15).

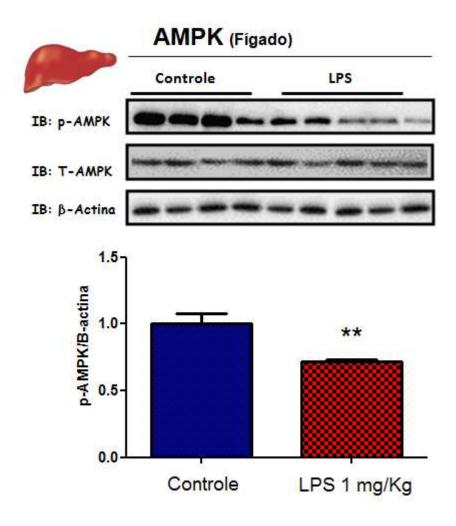


Figura 14: *Imunoblot* representativo do nível de fosforilação e quantidade da proteína AMPK hepática. A fosforilação da AMPK foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1mg/Kg-IP) (• n: 5) e Grupo Controle (salina) (• n: 4). Os valores representam a média ± EPM. * p<0,05 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.12 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre fosforilação da ACC hepática.

A ACC é modulada pela AMPK, desta maneira a sua fosforilação pode ser empregada como indicação da atividade da AMPK. Como pode ser observado na figura 15. Os animais tratados com LPS (1 mg/Kg) não apresentaram alteração na quantidade de ACC hepática, mas apresentaram significativa redução (60%) na fosforilação se comparado ao grupo controle (Salina).

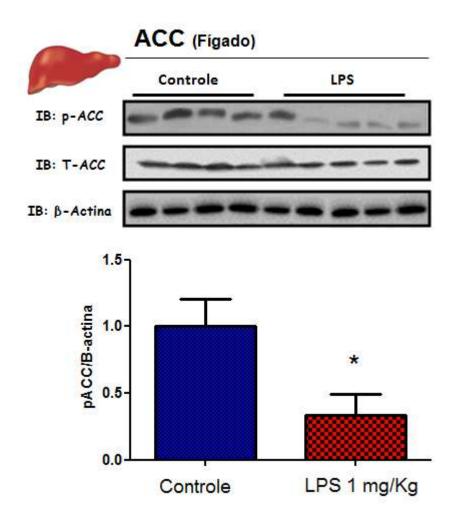


Figura 15: *Imunoblot* representativo do nível de fosforilação e quantidade da proteína ACC hipotalâmica. A fosforilação da ACC foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) e Grupo Controle (salina) (• n: 4). Os valores representam a média ± EPM. * p<0,05 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.13 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre a quantidade e expressão de PEPCK hepática.

O tratamento com LPS (1 mg/Kg) modificou a expressão e a quantidade a da proteína PEPCK (figura A), o tratamento reduziu 80% da quantidade de PEPCK e redução de 62% na expressão de mRNA (figura B) se comparado ao grupo controle (Salina). Os animais tratados com LPS (1 mg/Kg) não apresentaram alteração na quantidade de Beta-actina.

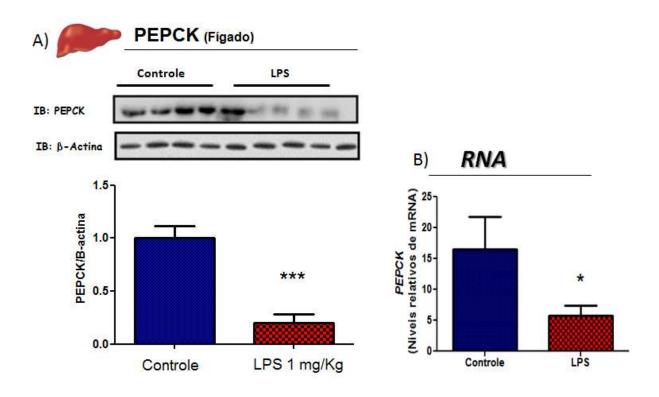


Figura 16: *Imunoblot* representativo do da quantidade de proteína e RNAm da PEPCK hepática. A proteína PEPCK foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) e Grupo Controle (salina) (• n: 4). Os valores representam a média ± EPM.*** p<0,001 para western blot e * p<0,05 para RNAm; LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.14 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre a quantidade de G6Pase hepática.

O tratamento com LPS (1 mg/Kg) reduziu em 45% a quantidade de G6Pase (figura A) se comparado ao grupo controle (Salina), entretanto a diferença na expressão de mRNA (figura B) para G6Pase não foi significativa.

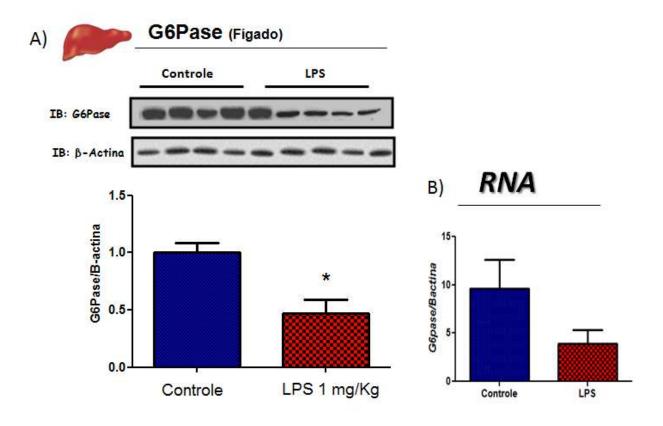


Figura 17: *Imunoblot* representativo da quantidade da proteína e RNAm da G6Pase hepática. A proteína G6Pase foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) e Grupo Controle (salina) (• n: 4). Os valores representam a média ± EPM. * p<0,05 para western blot LPS (1 mg/Kg) vs controle; o RNA não a representa a média ± EPM. * p<0,05.

7.15 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre fosforilação dos fator de transcrição hepático STAT3.

O tratamento com LPS (1 mg/Kg) não promoveu alteração na quantidade total da STAT3 no fígado. Entretanto, o tratamento com LPS resultou em um aumento de 150% na fosforilação da proteína STAT3 hepática se comparado ao grupo controle (Salina) (Fig. 20).

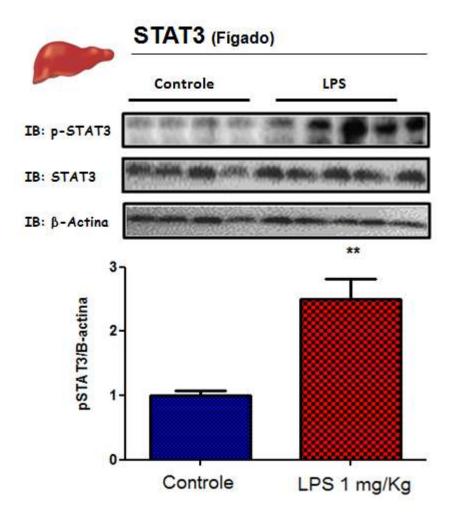


Figura 18: *Imunoblot* para avaliação da fosforilação da STAT3 (p-STAT3) e da proteína total T-STAT3 no fígado de camundongos dos grupos controle (• n: 4) e tratados com LPS (1mg/Kg-IP) (• n: 5). Os valores representam a media ± EPM. ** p<0,01 para LPS 1mg/Kg vs controle.

7.16 Avaliação da modulação da proteína FOXO1 no fígado após a tratamento com LPS (1 mg/Kg).

O tratamento com LPS (1mg/Kg) resultou em um aumento de 70% na fosforilação e da FOXO1 nos animais tratado se comparado ao grupo controle (salina) indicando sua inatividade.

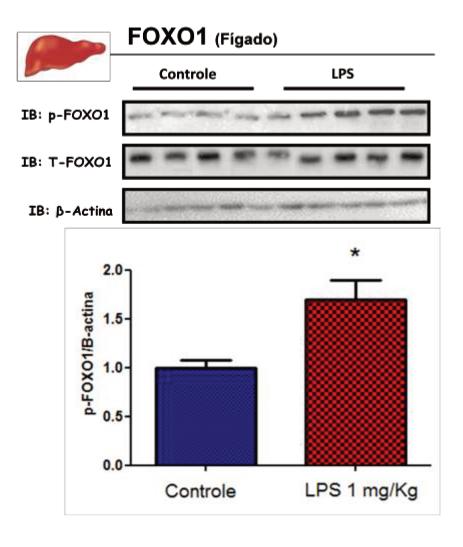


Figura 19: *Imunoblot* representativo do nível de fosforilação e quantidade da proteína FOXO1 no fígado. A fosforilação da FOXO1 foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) e Grupo Controle (salina) (• n: 4). Os valores representam a média ± EPM. * p<0,05 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.17 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre a quantidade de TLR4 no Fígado.

Para avaliar se o tratamento com LPS poderia afetar a expressão da proteína TLR4 no fígado foi realizado o western blot do extrato total deste tecido em animais controle e animais tratados com LPS. A figura 22 mostra que a quantidade de TLR4, após tratamento com LPS (1 mg/kg), não foi diferente entre os dois grupos avaliados (controle e LPS).

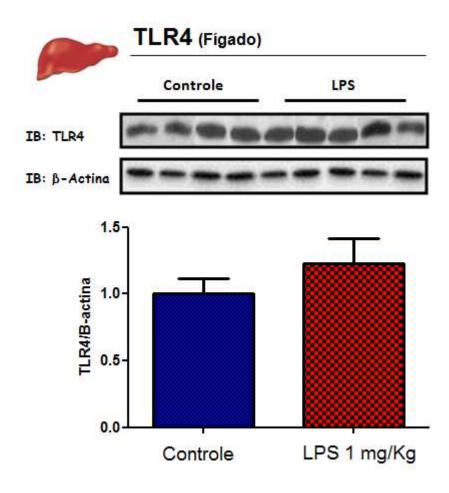


Figura 20: *Imunoblot* representativo da quantidade da proteína TLR4 hepática. A quantidade da proteína TLR4 foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) e Grupo Controle (salina) (• n: 4). Os valores não representam a média ± EPM. * p<0,05 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.18 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre a quantidade e fosforilação da JNK hepática.

O tratamento com LPS (1 mg/Kg) não modificou a quantidade da proteína JNK hepática no grupo tratado. Contudo, o grupo tratado com LPS apresentou aumento de 26% na fosforilação da proteína JNK hepática, se comparado ao grupo controle (Salina).

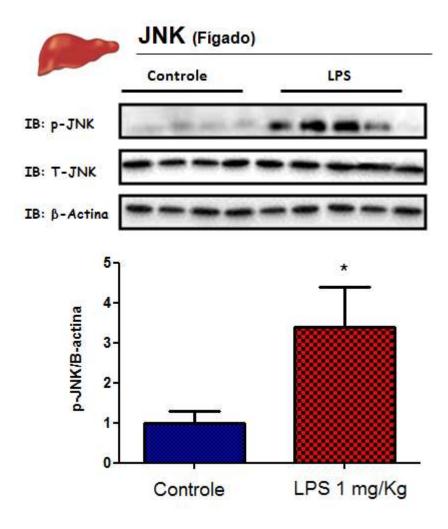


Figura 21: *Imunoblot* representativo da fosforilação e quantidade da proteína JNK no fígado. A fosforilação da JNK foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) e Grupo Controle (salina) (• n: 4). Os valores representam a média ± EPM. * p<0,05 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.19 Avaliação do teste de tolerância a glicose por administração Intraperitonial (GTTip) nos animais previamente tratados com LPS intraperitoneal (1mg/Kg).

Como pode ser observado na figura 22 os animais tratados com LPS (1 mg/Kg) e submetidos ao teste de tolerância a glicose (GTT) 4 horas após a administração do LPS apresentaram uma área sob a curva (AUC) 30% menor se comparado a AUC do grupo controle. A AUC foi obtida a partir da glicemia basal, 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose.

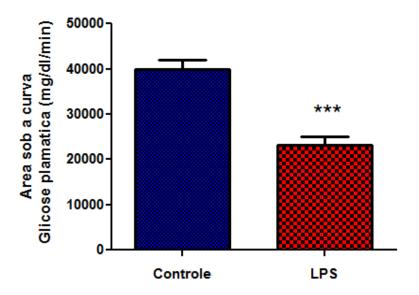


Figura 22: Curva glicêmica durante o teste de tolerância a glicose (GTT) em animais do Grupo LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 15) e Grupo Controle (salina) (• n: 15). *** p<0,001 para controle vs LPS 1 mg/Kg. Os valores representam média ± EPM.

7.20 Avaliação do teste de tolerância ao piruvato por administração intraperitonial (PTTip) nos animais previamente tratados com LPS intraperitoneal (1mg/Kg).

Os animais tratados com LPS (1 mg/Kg) apresentaram glicemia 25% menor após o desafio ao piruvato no tempo de 30 minutos se comparado ao grupo controle.

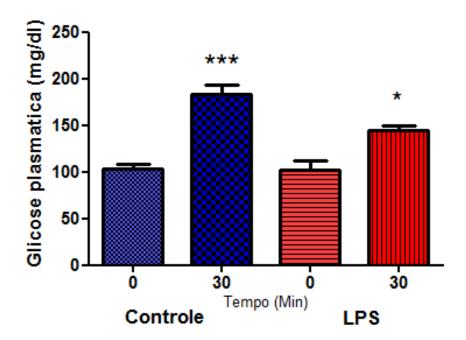


Figura 23: Glicemia durante o teste de tolerância ao piruvato (PTT) em animais do Grupo LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 5) e Grupo Controle (salina) (• n: 5). *** p<0,001 e * p<0,05 para controle vs LPS 1 mg/Kg. Os valores representam média ± EPM.

7.21 Avaliação do efeito do LPS sobre os níveis plasmáticos de glicose durante o tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) em animais previamente tratado via ICV com ativador farmacológico da AMPK (AICAR).

Foi avaliado na figura 24 a ação do LPS frente à resposta contrarregulatória ocasionada pela ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica. O grupo que recebeu LPS (1 mg/Kg) e 2mmol de AICAR via intracerebroventricular (ICV), (LPS+AICAR), apresentou uma área sob a curva maior (AUC) 35% maior se comparado com o grupo que recebeu somente LPS (1 mg/Kg).

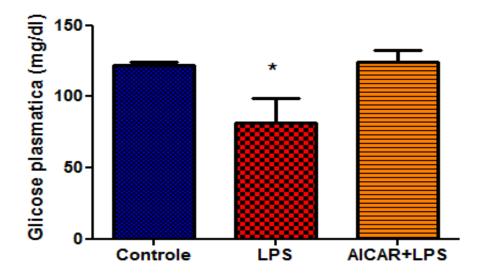


Figura 24: Curva glicêmica de camundongos tratados com LPS ou salina e/ou AICAR 2mmol (ICV). Grupos controle-salina (• n: 4); LPS 1 mg/Kg (• n: 4); LPS1 mg/Kg + AICAR (ICV) (• n: 5). * p<0,05 para controle, LPS + AICAR (ICV) vs LPS 1 mg/Kg. Os valores representam média ± EPM.

7.22 Avaliação da fosforilação da AMPK hipotalâmica após a ativação farmacológica com AICAR sobre o tratamento com lipopolissacarídeo (LPS).

Foi avaliada a ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica após o tratamento com LPS (1 mg/Kg). O grupo LPS apresentou a fosforilação da AMPK hipotalâmica 70% menor que o grupo CONTROLE. Entretanto, os grupos que receberam LPS (ip) e 2 mmol de AICAR via intracerebroventricular (ICV) (LPS + AICAR) e grupo que recebeu apenas AICAR, apresentaram a fosforilação da AMPK hipotalâmica 60% maior que o grupo de recebeu somente LPS (1 mg/Kg).

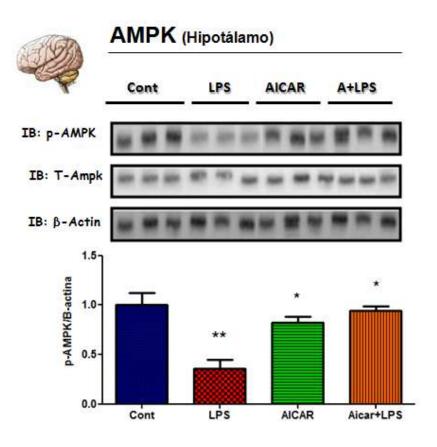


Figura 25: *Imunoblot* representativo do nível de fosforilação e quantidade da proteína AMPK no hipotálamo após a ativação farmacológica com AICAR via ICV. A fosforilação da AMPK foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos Controle (• n: 3), LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 3), AICAR (• n: 3) e AICAR+LPS (• n: 3). Os valores representam a média ± EPM * p<0,05 para AICAR + LPS e AICAR vs LPS e ** p<0,01 para LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.23 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre a quantidade da PEPCK hepática após a ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica com AICAR.

O tratamento com LPS (1 mg/Kg) não diminui a quantidade da proteína PEPCK após a ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica com AICAR 2 mmol. O grupo (AICAR + LPS) e grupo (AICAR) apresentam um aumento de 130% e 110% na quantidade de PEPCK em relação ao grupo LPS (1 mg/Kg). O tratamento com LPS reduziu 70% da quantidade PEPCK se comparado com o grupo controle (figura A). O tratamento com LPS reduziu 11% da expressão de mRNA da PEPCK se comparado ao grupo controle (Salina) (figura B). O tratamento prévio com AICAR (ICV) preveniu o efeito do LPS sobre a quantidade de proteína e RNAm para PEPCK. Os animais não apresentaram alteração na quantidade de Beta-actina.

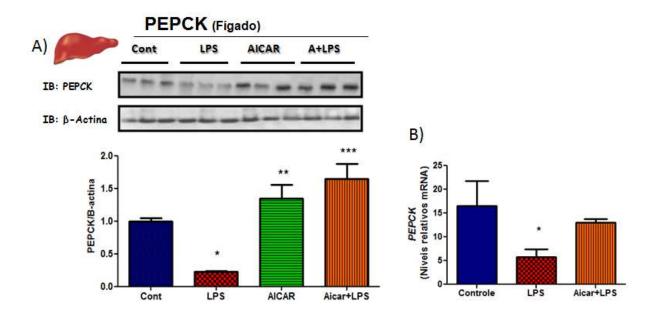


Figura 26: *Imunoblot* representativo da quantidade da proteína e RNAm para PEPCK hepática após a ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica com 2 mmol de AICAR (ICV) e tratamento com LPS 1 mg/kg. A PEPCK foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (• n: 3), Controle (• n: 3), AICAR (• n: 3) e AICAR+LPS (• n: 3). Os valores representam a média ± EPM *** p<0,001 para AICAR+LPS vs LPS; ** p<0,01 para AICAR vs LPS; e *p<0,05 LPS (1 mg/Kg) vs controle.

7.24 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre a quantidade da G6Pase hepática após a ativação farmacológica da AMK hipotalâmica com AICAR.

O tratamento com LPS (1 mg/Kg) não modificou a quantidade da proteína G6Pase após a ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica com 2 mmol de AICAR. Não foi observada diferença significativa entre os grupos CONTROLE, LPS, AICAR+LPS e AICAR.

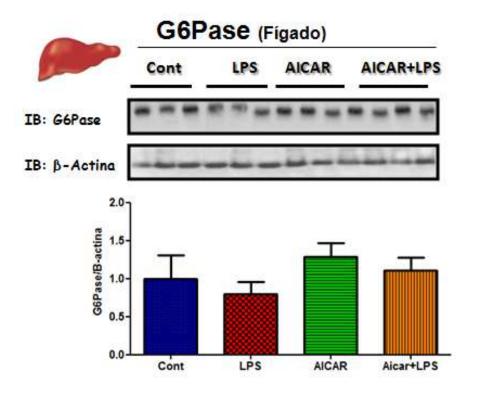


Figura 27: *Imunoblot* representativo do nível de fosforilação e quantidade da proteína G6Pase no fígado após a ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica e tratamento com LPS 1 mg/kg. A proteína G6Pase foi normalizada utilizando a proteína beta-actina como controle. Grupos LPS (1 mg/Kg-IP) (•n: 3), Controle (• n: 3), AICAR 2 mmol (• n: 3) e AICAR+LPS (• n: 3). Os valores não representam média ± EPM p<0,05.

7.25 Avaliação dos níveis plasmáticos de glicose durante o tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) em animais C3H/HEJ e C3H/HEN (controle).

Para avaliar a contribuição do receptor TLR4 para o desenvolvimento da hipoglicemia após tratamento com LPS, foram utilizados camundongos mutantes do receptor TLR4 (C3H/HeJ) e camundongos *Wild Types* (C3H/HeN). O tratamento com LPS (1 mg/kg) dos animais C3H/HeN (receptores normais/ativos) promoveu uma diminuição de (35%) na glicemia. Com também foi observado em outros experimentos (figuras 4 e 23) que empregaram camundongos Swiss. Contudo, a administração de LPS nos animais C3H/HeJ não resultou em alteração significativa da glicemia após tratamento com LPS 1 mg/kg.

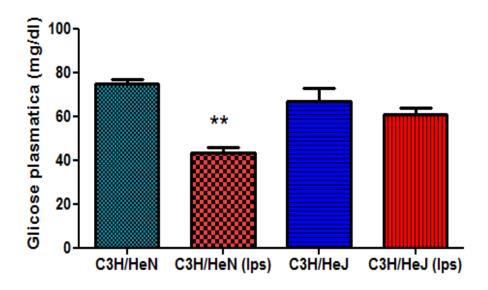


Figura 28: Glicemia de camundongos C3H/HeN e C3H/HeJ tratados com LPS ou salina. Grupo C3H/HeN controle-salina (\bullet n: 4); grupo C3H/HeN LPS 1 mg/Kg (\bullet n: 4); grupo C3H/HeJ controle-salina (\bullet n: 4); grupo C3H/HeN LPS 1 mg/Kg (\bullet n: 4). Os valores representam média \pm EPM ** p<0,01

7.26 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre fosforilação da AMPK hipotalâmica em animais C3H/HEJ e C3H/HEN (controle).

Para avaliar a participação do receptor TLR4 no processo de desfosforilação da proteína AMPK hipotalâmica após tratamento com LPS, foram utilizados mutantes do receptor TLR4 (C3H/HeJ) e camundongos *Wild Types* (C3H/HeN). O tratamento dos animais C3H/HeN (receptores normais/ativos) com LPS (1mg/kg) promoveu uma diminuição de (40%) na fosforilação da proteína AMPK hipotalâmica, se comparados ao grupo C3H/HeN que recebeu salina. Nos animais C3H/HeJ tratados com LPS não houve alteração na fosforilação da proteína AMPK hipotalâmica a após tratamento com LPS 1 mg/kg. Os animais não apresentaram alteração na quantidade de Beta-actina.

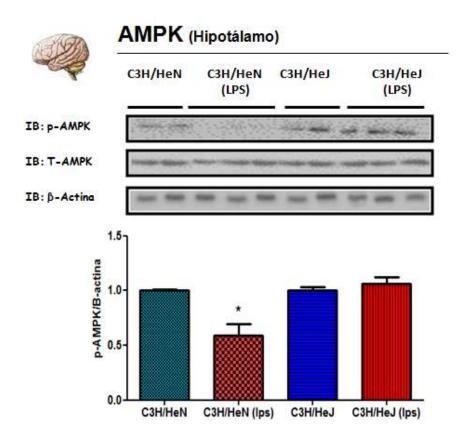


Figura 29: *Imunoblot* representativo do nível de fosforilação e quantidade da proteína AMPK hipotalâmica nos camundongos C3H/HeN e C3H/HeJ tratados com LPS ou salina. Grupo C3H/HeN controle-salina (• n: 4); grupo C3H/HeN LPS 1 mg/Kg (• n: 4); grupo C3H/HeJ controle-salina (• n: 4); grupo C3H/HeN LPS 1 mg/Kg (• n: 4). Os valores representam média ± EPM. * p<0,05 C3H/HeN LPS vs C3H/HeN salina.

7.28 Avaliação do efeito do tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) sobre fosforilação da PEPCK hepática hipotalâmica em animais C3H/HEJ e C3H/HEN (controle).

Na figura 30 os animais C3H/HeJ (camundongos com deficiência na ativação/sinalização do receptor TLR4) e animais C3H/HeN (*Wild Type*), foram tratados com LPS 1 mg/kg e salina. Os animais C3H/HeN tratados com LPS apresentam uma diminuição de 30% na quantidade de PEPCK com comparado aos animais C3H/HeN que receberam salina. Os animais C3H/HeJ tratados com LPS não apresentaram alteração na quantidade da proteína PEPCK após tratamento com LPS 1 mg/kg. Os animais não apresentaram alteração na quantidade de Beta-actina.

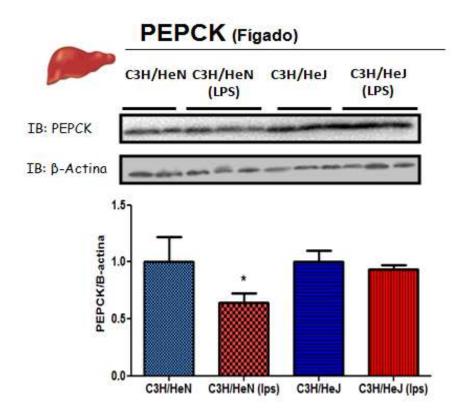


Figura 30: *Imunoblot* representativo do nível de quantidade da proteína PEPCK no fígado dos camundongos C3H/HeN e C3H/HeJ tratados com LPS ou salina. Grupo C3H/HeN controle-salina (• n: 4); grupo C3H/HeN LPS 1 mg/Kg (• n: 4); grupo C3H/HeJ controle-salina (• n: 4); grupo C3H/HeN LPS 1 mg/Kg (• n: 4). Os valores representam média ± EPM * p<0,05. C3H/HeN LPS vs C3H/HeN salina.

7.29 Avaliação dos níveis hormonais de insulina, Glucagon e Corticosterona no soro de animais tratados com lipopolissacarídeo (LPS).

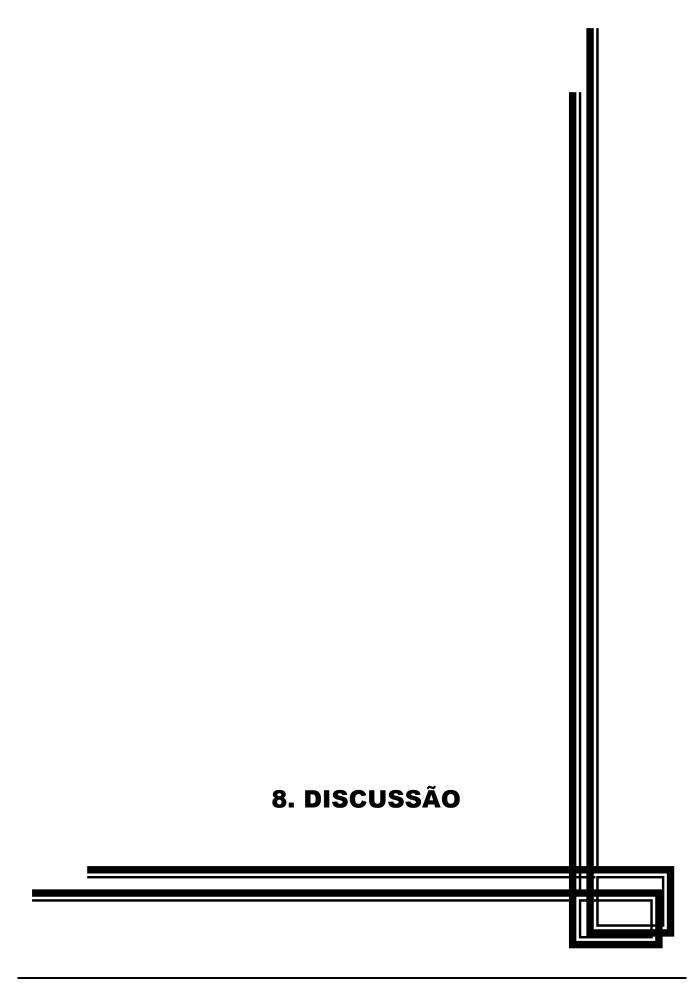
O tratamento com LPS (1 mg/Kg) promoveu um aumento significativo na concentração sérica de TNFα nos animais Swiss e nos *Wild Types* (C3H/HeN) tratados com LPS: Swiss (LPS) 639 ± 118 pg/mL *versus* 7,51 ± 1,8 pg/mL (animais Controle). Os animais Wild Type C3H/HeJ tratados com LPS apresentam 523,9 ± 11,2 pg/ml *versus* 45,49±5,1 do grupo Controle; os animais C3H/HeJ (camundongos com receptor TLR4 mutante) não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Também foram observados aumentos séricos na concentração dos hormônios insulina e glucagon após o tratamento com LPS (1 mg/Kg) nos animais Swiss grupo LPS 376,7 ± 82,9 (pM) *versus* 150,3 ± 7,3 (pM) grupo controle. A concentração sérica de Glucagon nos animais Swiss também apresentou aumento significativo no grupo LPS 47,5 ± 13,2 (pM) e 16,02 ±5.1 (pM) no grupo CONTROLE como mostrado na tabela a baixo.



TABELA 1. Nivel sérico de citocinas e hormonios

Grupos (n=4)	<u>Swiss</u>			C3H/HeJ		C3H/HeN	
	Controle	LPS	AICAR+LPS	Controle	LPS	Controle	LPS
TNF-α (pg/ml)	7.51 +- 1.8	639.0+-118.8 *	388.6+-123	45.49+-5.1	523.9+-11.2*	50.81+-1	100.2+-81.9
IL1-β (pg/ml)	29.20 +- 2.9	142.7+-48.75	95.95+-33.3	19.30+-3.3	60.96+-14.1	21.15+-1.5	30.70+-9.8
Insulina (pM)	150.3+- 7.3	376.7+-82.9 *	-	-	-	-	-
Glucagon (pM)	16.02 ± 5.1	47.5 ± 13.2 *	-	-	-	-	-

Tabela 1: Concentração sérica das citocinas (TNF α e IL1 β) e hormônios (Insulina e Glucagon) de camundongos Swiss; C3H/HeJ e C3H/HeJ tratados LPS 1 mg/Kg ou salina. Os valores representam média \pm EPM. * p<0,05 grupos LPS vs controle (n: 4), TNF- α , Insulina e Glucagon.



8. DISCUSSÃO

Atualmente, os processos inflamatórios sistêmicos têm recebido grande atenção em estudos que procuram compreender a sua relação com a obesidade, diabetes e a sinalização intracelular (VELLOSO *et al.*, 2009; GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011).

A AMPK hipotalâmica é uma proteína com importante participação na resposta contrarregulatória por ser ativada em condições de baixa disponibilidade de energia e ser capaz de modular o metabolismo celular através da inibição de vias anabólicas e ativação de vias catabólicas. Sua ativação em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo cursa com o aumento da expressão de neuropeptídeos orexígenos, menor gasto energético e a produção de glicose hepática (HAN, 2005; NAMKOONG, 2005; SEO *et al.*, 2008).

Desde o início da década de 80 os estudos em modelos de sepse tem procurado desvendar os mecanismos bioquímicos envolvidos com nesta doença visando entender o que leva a os distúrbios da homeostase glicêmica (HOLMAN & SABA, 1988, GUILLEM et al, 1982; ARDAWI et al, 1989). Estes estudos mostraram que durante a evolução da sepse a capacidade do fígado de sintetizar glicose é significantemente reduzida. Em estudos mais recentes, este evento foi associado à ação das citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas que modulam a ativação e expressão de fatores de transcrição tais como STAT3, FOXO1 e PGC1α (YERKOVICH et al., 2004; CHICHELNITSKIY et al., 2009; RAMADOSS, 2009; PHILLIPS, 2010; MIAO et al., 2012). Durante a evolução do quadro de endotoxemia ou sepse ocorre o aumento do consumo de glicose por tecidos ricos em macrófagos, tais como fígado e baço, e o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNFα, interleucina 6 (IL6) e IL1-β, principalmente através do receptor TLR4 pelo seu ligante o LPS (MIZOCK, 1995; MIZOCK 2001; KAWAI & AKIRA, 2006; OSTUNI & ZANONI, GRANUCCI, 2010; TWEEDELL et al. 2011). Inicialmente um quadro de hiperglicemia pode ser observado e este ser seguido por hipoglicemia decorrente da inibição da PEPCK hepática nas primeiras 4 horas após o tratamento (MCCALLUM, 1981; KUTTNER et al., 1986; MAITRA et al., 1999; GILL & STERLING, 2001). Entretanto, o aumento na demanda por glicose não traria danos para a homeostase se a glicemia fosse corrigida pela maior ativação e utilização de substratos neoglicogênicos pelo fígado.

Embora os estudos que investiguem a relação entre as citocinas inflamatórias e os danos na sinalização de hormônios no hipotálamo sejam extensos, o efeito destas citocinas sobre a proteína AMPK hipotalâmica ainda é pouco conhecido. Além disso, também não existem estudos na literatura que tenham explorado a relação entre a ativação de TLR4 por LPS e seu efeito sobre a AMPK hipotalâmica e a produção de glicose hepática.

Considerando a importância da proteína AMPK hipotalâmica na modulação da resposta contrarregulatória e produção hepática de glicose durante a hipoglicemia e o jejum, nossa hipótese foi de que a ação das citocinas inflamatórias e a ativação da via do receptor TLR4 poderia desempenhar importante papel na modulação da homeostase da glicose. O tratamento com LPS promoveu redução da glicemia de jejum nas diferentes doses empregadas, mas apenas na dose de 1 mg/Kg seu efeito foi significativo, ocorrendo também diminuição da ingestão alimentar e aumento significativo da concentração sérica das citocinas. Nestes animais a proteína AMPK hipotalâmica também apresentou menor fosforilação, assim como a proteína ACC, uma proteína alvo da AMPK, sugerindo menor atividade desta quinase. É importante salientar que este efeito no hipotálamo foi observado em jejum, uma já descrita condição relacionada com a ativação da AMPK hipotalâmica, provavelmente pela redução da disponibilidade da glicose (HAN, 2005; NAMKOONG, 2005; MINOKOSHI et al., 2004, PASCOE & SMYTHE, STORLIEN, 1989; ROPELLE et al., 2007). Além disso, também observamos o aumento da fosforilação da proteína STAT3 hipotalâmica que tem papel importante na desfosforilação da AMPK promovida pela leptina. A proteína STAT3 pode ser ativada pela leptina através da fosforilação pela JAK2 ou ser ativada por TNF-α e IL6, desencadeando os efeitos clássicos atribuídos à ação central destas citocinas, tais como redução da fome, aumento da temperatura corpórea e aumento do gasto energético (RIZK, 2001; BORGES, 2011). Neste sentido, Borges e colaboradores demonstraram que os efeitos centrais das citocinas inflamatórias e da leptina têm proteínas em comum, tais como a AMPK e STAT3 (YAMAWAKI et al., 2010; BORGES, 2011). Desta maneira, embora a glicemia tenha sido reduzida pelo tratamento com LPS, é provável que a ação central de citocinas pró-inflamatórias impeça a fosforilação e ativação da AMPK. Este efeito também foi acompanhado por significativa redução na ingestão noturna de ração e na área sob a curva durante o teste de tolerância a glicose se comparado ao grupo controle.

Estes resultados nos mostram que o tratamento com LPS está promovendo intensa modulação dos parâmetros fisiológicos relacionados à homeostase da glicose.

Embora a resposta contrarregulatória seja exercida por diferentes mecanismos hormonais e bioquímicos, importantes alterações tais como, a diminuição da área sob a curva no desafio ao piruvato e a redução da glicemia mostram que há redução na capacidade hepática de produzir glicose em animais que receberam o LPS. Os estudos iniciais que demonstraram os danos na neoglicogênese pelo tratamento com LPS (MAITRA et al.,1999; GILL & STERLING, 2001) foram recentemente corroborados e demonstraram que a expressão de proteínas neoglicogênicas é modulada pela proteína STAT-3, JNK e FOXO1 no fígado (INOUE, 2004; ; RAMADOSS, 2009; PHILLIPS, 2010). É conhecido que a proteína FOXO1 possui íntima relação com a transcrição de proteínas neoglicogênicas (PHILLIPS, 2010), quando fosforilada a FOXO1 está inativa saindo do núcleo para o citoplasma, nesta situação ocorre à inibição da transcrição de proteínas neoglicogênicas tais como a PEPCK e G6Pase, a inibição dessas proteínas também é modulada pela ação das proteínas STAT3 e JNK (INOUE, 2004; RAMADOSS, 2009; JIAO; FENG; XU, 2012).

A JNK é uma serina quinase que participa da via de sinalização do TNFα e está intimamente ligada aos processos inflamatórios da sepse. O TNFα é produzido através da ativação do NFKB que também é ativado pela via de sinalização do TLR4. Alem do TNFα, o NFKB na participa da via do TLR4 transcrevendo citocinas pró-inflamatórias, como o IL6, que tem a STAT3 como uma proteína chave na sua via de sinalização. A STAT3 como classicamente descrita na literatura participa da via da leptina, TNFα e IL6 sendo ativa por fosforilação e promovendo a inibição da transcrição de proteínas neoglicogênicas (RIZK, 2001), evento que também é observado pela ação da serina quinase JNK (YERKOVICH *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2010). A JNK e STAT3 são importantes proteínas que modulam negativamente a transcrição das proteínas neoglicogênicas (PEPCK e G6Pase (PHILLIPS, 2010; YANG *et al.*, 2010).

Neste sentido, os resultados obtidos até o momento nos mostram que as proteínas STAT-3 e FOXO1 no fígado encontram-se mais fosforiladas, sugerindo maior atividade da STAT-3 e inibição da FOXO1, foi também verificado aumento na fosforilação da JNK hepática e aumento nos níveis de insulina com tratamento de LPS (como mostrado na tabela nos resultados). É conhecido que a ação da insulina no sistema nervoso central é capaz de

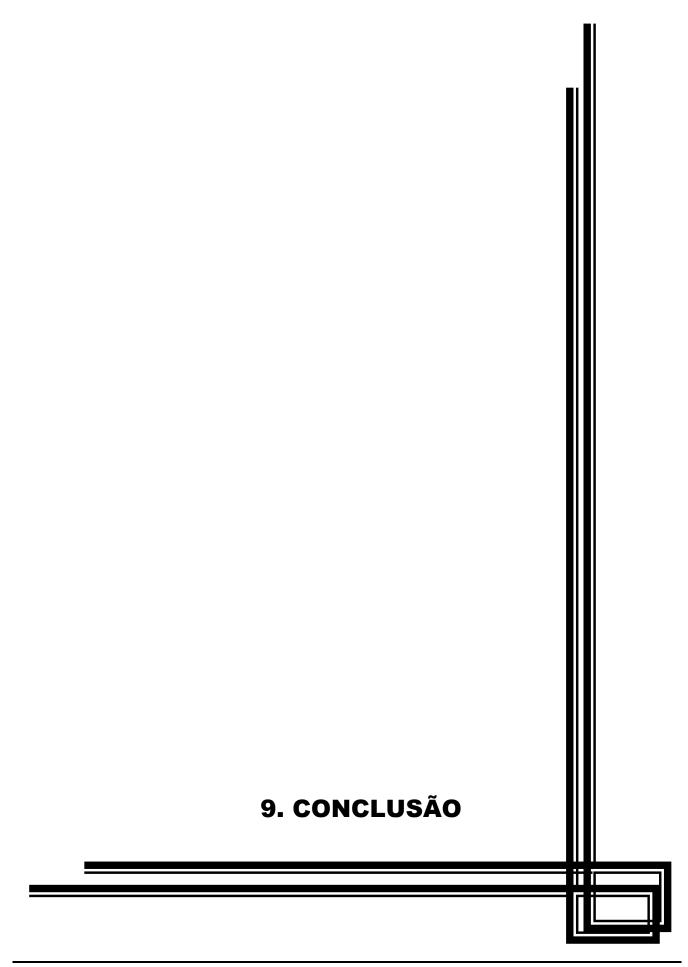
reduzir a síntese de glicose de maneira dependente da STAT-3 (INOUE *et al.*, 2006). Esse dados são corroborados pela diminuição da quantidade de G6Pase e PEPCK no fígado, diminuição de mRNA da PEPCK (mRNA do G6Pase não apresentou diferença significativa) e também pela diminuição da produção de glicose (avaliada pelo PTT), sugerindo que o prejuízo na produção de glicose possa ter sido ocasionado tanto pelo processo inflamatório induzido pela ativação do TLR4, citocinas inflamatórias (TNF-α, IL6 e IL1β) (INOUE *et al.*, 2006; RAMADOSS *et al.*, 2009; PHILLIPS, 2010; YANG *et al.*, 2010). Contudo não podemos descartar que a insulina neste momento também esteja agindo diretamente no fígado e no hipotálamo levando a redução na produção de glicose pelo fígado (INOUE *et al.*, 2006).

Como é conhecido e também foi descrito acima, a AMPK hipotalâmica é uma importante proteína responsável pela ativação da resposta contrarregulatória em períodos de jejum, glicemia baixa e déficit de energia, estimulando a secreção de hormônios catabólicos (HAN et al., 2005; FAN et al., 2009). Como a AMPK hipotalâmica tem papel fundamental no controle dos mecanismos que reestabelecem a glicemia basal, avaliamos o efeito da ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica através da administração de AICAR 2 mmol por via intracerebroventricular para avaliar a ação da ativação da AMPK frente a sepse. Interessantemente, observamos que os animais que receberam previamente AICAR intracerebroventricular e posteriormente foram tratados com LPS, não apresentaram aumento na glicemia se comparado ao grupo que recebeu somente LPS, indicando o restabelecimento na glicemia. Han e colaboradores (2005) demonstraram que a ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica com AICAR exerce uma importante função no restabelecimento da glicemia, como observado em animais induzidos à hipoglicemia através da administração de insulina, sendo também observada, uma maior secreção de catecolaminas, corticosterona e glucagon (HAN et al., 2005).

Após verificarmos o aumento na glicemia pelo tratamento prévio com AICAR investigamos ativação/fosforilação da AMPK hipotalâmica. O tratamento prévio com AICAR impediu a redução da fosforilação da AMPK hipotalâmica, corroborando o resultado observado de que estes animais apresentam maior glicemia que os animais LPS. Nestes animais também observamos o aumento na quantidade de G6Pase e PEPCK, e aumento na expressão de mRNA de PEPCK se comparado ao grupo que só recebeu LPS. Indicando que

a modulação da AMPK hipotalâmica é essencial para o reestabelecimento da glicemia e produção de glicose hepática (SHIUCHI, 2011).

Após avaliarmos os efeitos positivos da ativação da AMPK hipotalâmica sobre o metabolismo, investigamos o papel do receptor TRL4 frente da atividade da AMPK hipotalâmica e a produção de glicose hepática. Para isso foram utilizados animais com mutação no receptor TLR4 (C3H/HeJ) e seus controles selvagens (C3H/HeN). Observamos que após a administração de LPS (1mg/kg) nos animais selvagens (C3H/HeN – LPS) ocorreu diminuição significativa da glicemia se comparados aos seus respectivos controles (C3H/HeN - salina), também foi observado uma significativa diminuição na fosforilação da AMPK hipotalâmica e diminuição da quantidade de PEPCK no fígado dos animais tratados com LPS. Estes resultados corroboram aos observados nos animais Swiss. Interessantemente os animais mutantes do receptor de TLR4, que foram tratados com LPS, não apresentaram diminuição da glicemia, assim como também não foi observado qualquer efeito sobre a fosforilação da AMPK hipotalâmica e quantidade de PEPCK. Os resultados deste trabalho juntamente com os dados existentes na literatura sugerem que a via do receptor TLR4 possui um importante papel na indução da hipoglicemia, pela inibição da proteína AMPK hipotalâmica e posteriormente, pela inibição das proteínas neoglicogênicas hepáticas. Adicionalmente nossos resultados mostram que a prévia ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica nos animais tratados com LPS preveniu parcialmente os eventos ocasionados pela inflamação. Desta maneira, acreditamos que a AMPK hipotalâmica é um alvo importante para os estudos que procuram desenvolver novos fármacos que melhorem a sobrevida de pacientes com sepse.



9. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou os danos a homeostase glicêmica oriundos do quadro de sepse/endotoxemia, onde há inibição de importantes vias que controlam a manutenção da glicemia, como a via da AMPK hipotalâmica e vias que controlam a produção de glicose hepática. Todavia com a ativação farmacológica da AMPK hipotalâmica os danos no restabelecimento da glicemia são minimizados mostrando que a via AMPK hipotalâmica é um importante alvo terapêutico para controle da glicemia na sepse/endotoxemia.

10. REFERENCIAS

- AGATI, J. M.; YEAGLEY, D.; QUINN, P. G. 1998. Assessment of the role ofmitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol3Kinase protein kinase B, and protein kinase C in insulin inhibition of cAMP-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene tran -scription. J. Biol. Chem. N.273. Vol. 30 p.18751-18759.
- 2. AKIRA, S. & TAKEDA, K. (2004) **Toll-like receptor signalling.** *Nat Rev Immunol* **4** 499-511.
- 3. ALQUIER, T.; KAHN, B. B. (2004) **Peripheral signals set the tone for central regulation of metabolism.** *Endocrinology.* vol.145, no 9, p.4022-4024.
- 4. ARDAWI, M. S.; ASHY, A. A.; JAMAL, Y. S.; KHOJA, S. M., (1989). Metabolic control of hepatic gluconeogenesis in response to sepsis. *J lab clin med.* N114 Vol5, p579-86.
- 5. BAPTISTE, C. (2007) **Cellular mechanisms in sepsis** *J Intensive Care Med.* 2007; 22(2):63-72.
- 6. BORGES, B. C.; RORATO, R.; AVRAHAM. Y.; DA SILVA, L. E.; CASTRO, M.; VOROBIAV, L.; BERRY. E.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. (2011). Leptin resistance and desensitization of hypophagia during prolonged inflammatory challenge. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* N. 300 vol. 5 p.858-69
- 7. CARLING, D. (2005) **AMP-activated protein kinase: balancing the scales.** *Biochimie.* vol. 87, no. 1, p.87-91.
- 8. CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. (2002). Vias de Sinalizacao da Insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia 46(4):** 419-425.
- 9. CARVALHO, B.M; GUADAGNINI, D.; TSUKUMO, D.M.; SCHENKA, A.A.; LATUF-FILHO, P.; VASSALLO, J.; DIAS, J.C.; KUBOTA, L.T.; CARVALHEIRA, J.B.; SAAD, M.J. (2012). Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*. 5510:2823-34.
- CHAKRAVARTHY, M.; V. ZHU, Y.; YIN, Y.; COLEMAN, T.; PAPPAN, K. L. CONNIE, A.; MARSHALL, M. L.; MCDANIEL, C.; SEMENKOVICH, F. (2009) Inactivation of hypothalamic FAS protects mice from diet-induced obesity and inflammation. J. Lipid. Res. 50: 630–640.

- 11. CHIASSON, J. L.; ATKINSON, R. L.; CHERRINGTON, A. D.; KELLER, U.; SINCLAIR-SMITH, B. C.; LACY, W. W.; LILJENQUIST, J. E. (1979). **Effects of fasting on gluconeogenesis from alanine in nondiabetic man.** *Diabetes.*; 28(1):56-60.
- 12. CHICHELNITSKIY, E.; VEGIOPOULOS, A.; DIAZ, M. D.; ZIEGLER, A.; KLEIMAN, A.; RAUCH, A.; TUCKERMANN, J.; & HERZIG, S. (2009). In Vivo Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Promoter Mapping Identifies Disrupted Hormonal Synergism as a Target of Inflammation During Sepsis in Mice por citocinas. *Hepatology*; 50:1963-1971;
- 13. DALVI, S. P.; NAZARIANS-ARMAVIL, A.; TUNG, S.; BELSHAM, D. D. (2011) Immortalized Neurons for the Study of Hypothalamic Function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Vol. 9, N.01.
- 14. DANDONA, P.; ALJADA, A. & BANDYOPADHYAY, A. (2004) Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25 4-7.
- 15. DEMPSEY, P.W,. DOYLE, S.E.; HE, J.Q.; CHENG, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. Cytokine Growth Factor Rev.14: 193-209.
- 16. DE SOUZA, C. T.; ARAUJO, E. P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R. L.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. & VELLOSO, L. A. (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146 4192-4199.
- 17. DOHGU, S.; FLEEGAL-DEMOTTA, M.A.; BANKS, W.A. (2011). Lipopolysaccharideenhanced transcellular transport of HIV-1 across the blood-brain barrier is mediated by luminal microvessel IL-6 and GM-CSF. *J Neuroinflammation*. No30; 8:167.
- 18. EVANS, M. L. et al. (2004). Hypothalamic ATP-sensitive K channels play a key role in sensing hypoglycemia and triggering counterregulatory epinephrine and glucagon responses. *Diabetes.* vol. 53, no.1 p.2542-2551.
- 19. FYLES, J. M.; CAWTHORNE, M. A.; HOWELL, S. L. (1986). The characteristics of beta-adrenergic binding sites on pancreatic islets of Langerhans. *J. Endocrinol* Vol 111N.2 p.263-270.
- 20. GAO, G.; ZHANG, B.; RAMESH, G.; BETTERLY, D.; TADAGAVADI, R.; WANG, W.; REEVES, W.B. (2013). **TNF-α mediates increased susceptibility to ischemic AKI in diabetes.** *Am J Physiol Renal Physiol.* p.203-240.
- 21. GUILLEM, J. G; CLEMENS, M. G.; CHAUDRY, I. H.; MCDERMOTT, P. H.; BAUE, A. E. (1982). Hepatic gluconeogenic capability in sepsis is depressed before changes in oxidative capability. *J Trauma*. Vol.22 N.9 p.723-9.

- 22. GILL, R. Q. & STERLING, R. K. (2001). **Acute liver failure.** *J. Clin Gastront* 33, 191–198.
- 23. GREGOR M. F. & HOTAMISLIGIL, G. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* Vol.29 p.415-445.
- 24. GROSS, D. N.; WAN, M.; BIRNBAUM, M. J. (2009). The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Curr Diab Rep.* Vol.9 N.3. p.208–214.
- 25. GUTIERREZ-JUAREZ, R.; OBICI, S. & ROSSETTI, L. (2004). **Melanocortin-independent effects of leptin on hepatic glucose fluxes.** *J Biol Chem* 279 49704-49715.
- 26. GUO, W.; LIU, W.; CHEN, G.; HONG, S.; QIAN, C.; XIE, N.; YANG, X.; SUN, Y.; XU, Q. (2012). Water-soluble andrographolide sulfonate exerts anti-sepsis action in mice through down-regulating p38 MAPK,STAT3 and NF-κB pathways. *Int Immunopharmacol.* 14(4):613-9.
- 27. HAN, S. M.; NAMKOONG, C.; JANG, P. G.; PARK, I. S.; HONG, S. W.; KATAKAMI, H.; CHUN, S.; KIM, S. W.; PARK, J. Y.; LEE, K. U.; *et al.* (2005). **Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats.** *Diabetologia* **48** 2170-2178.
- 28. HANAZAKI, K. (2009). Blood glucose control in patients with severe sepsis and septic shock. *World J. Gastroenterol.* Vol. 7. N.15. p.4132-4136
- 29. HAQUE, M. S.; MINOKOSHI, Y.; HAMAI, M.; IWAI, M.; HORIUCHI, M. & SHIMAZU, T. (1999). Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* 48 1706-1712.
- 30. HARDIE, D. G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117 5479-5487.
- 31. HE, F.; YIN, F.; PENG, J.; DENG, X.; WU, L.; ZHANG, C. (2010). Molecular mechanism for change in permeability in brain microvascular endothelial cells induced by LPS. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 35(11):1129-37.
- 32. HIROSUMI. J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GORGUN, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K.; KARIN, M. & HOTAMISLIGIL, G. S. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420 333-336.
- 33. HOLAMN, J. M.; SABA, T. M. (1988) Effect of bacterial sepsis on gluconeogenic capacity in the rat. *J Surg Res.* 45(2):167-75).

- 34. HOLST, J. J. 1985. **Neural regulation of pancreatic hormone secretion**. *Clin Physiol.* Vol5 N.5 p.34-42.
- 35. HUTCHINSONN, D. S. e BENGTSSON, T. **AMP-Activated Protein Kinase Activation by Adrenoceptors in L6 Skeletal Muscle Cells:** Mediation by α1-Adrenoceptors Causing Glucose Uptake. *Diabetes*. 2006. vol. 55 p.682–690.
- 36. IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5 987-995.
- 37. INOUE, H.; OGAWA, W.; OZAKI, M.; HAGA, S.; MATSUMOTO, M.; FURUKAWA, K.; HASHIMOTO, N.; KIDO, Y.; MORI, T, SAKAUE, H.; TESHIGAWARA, K.; JIN, S.; IGUCHI, H.; HIRAMATSU, R.; LEROITH, D.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; KASUGA, M. 2004. Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat Med.* Vol.10 N.2 p.168-74.
- 38. INOUE, H.; OGAWA, W.; ASAKAWA, A.; OKAMOTO, Y.; NISHIZAWA, A.; MATSUMOTO. M.; TESHIGAWARA, K.; MATSUKI, Y.; WATANABE, E.; HIRAMATSU, R.; NOTOHARA, K.; KATAYOSE, K.; OKAMURA, H.; KAHN, C. R.; NODA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; INUI, A.; KASUGA, M. 2006. Role of hepatic STAT3 in braininsulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* Vo.3 N.4 p.267-75.).
- 39. JAEGER, L.B.; DOHGU, S.; SULTANA, R.; LYNCH, J.L.; OWEN, J.B.; ERICKSON, M.A.; SHAH, G.N.; PRICE,T.O.; FLEEGAL-DEMOTTA, M.A.; BUTTERFIELD, D.A.; BANKS, W.A. (2009). Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. Brain Behav Immun. 23(4):507-17.
- 40. JIAO, P.; FENG, B.; XU, H. (2012). Mapping MKP-3/FOXO1 interaction and evaluating the effect on gluconeogenesis. *PLoS One*. 7(7):e41168.
- 41. KALHAN SC, HERTZ RH, ROSSI KQ, SAVIN SM. (1991) Alterations in oxidative metabolism and glutamine transport support glucose production in the tumor-influenced hepatocyte. *Metabolism.* Jun; 40(6):629-33).
- 42. KALHAN, S. C.; GILFILLAN, C. A.; TSERNG, K. Y.; SAVIN, S. M. (1988) Glucose-alanine relationship in diabetes in human pregnancy. *Metabolism.* 37(2):152-8.
- 43. KAWAI, T. & AKIRA, S. (2006) **TLR signaling.** *Cell Death Differ* 13 816-825.
- 44. KUTTNER, R. E.; SUGAI, T.; YAMASHITA, K.; SCHUMER, W.; APANTAKU, L. M. (1986) **Endotoxin lethality is intensified by inhibited gluconeogenesis.** *Circ Shock.* 19 (2):195-201.
- 45. LAM, T.K.; CARPENTIER, A.; LEWIS, G. F.; VAN DE WERVE, G.; FANTUS, I. G.; GIACCA, A. (2003). **Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production.** *Am J Physiol. Endocrinol. Metab.* vol.02, no.5, p.863-873.

- 46. LANDREE, L.E. (2004). C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. *J. Biol. Chem.* vol.07, no.5, p.3817-3827.
- 47. LEE, Y.H.; GIRAUD, J.; DAVIS, R.J.; WHITE, M.F. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J. Biological Chemistry.* 2003; 278: 2896-2902.
- 48. LEIBOWITZ, S.F. e WORTLEY, K.E. (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Elsevier.* vol. 25, no.1, p.473-504.
- 49. LERNER, R. G.; DEPATIE, C.; RUTTER, G.; SCREATON, R.; BALTHASAR, N. (2009). A role for the CREB co-activator CRTC2 in the hypothalamic mechanisms linking glucosesensing with gene regulation. *EMBO. Reports.* Vol. 10. N. 10.
- 50. LOPEZ, M. & VIDAL-PUIG, A. (2008) Brain lipogenesis and regulation of energy metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11 483-490.
- 51. LOPEZ, M.; LAGE, R.; SAHA, A. K.; PEREZ-TILVE, D.; VAZQUEZ, M. J.; VARELA, L.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; TOVAR, S.; RAGHAY, K.; RODRIGUEZ-CUENCA, S.; *et al.* (2008) **Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin.** *Cell Metab* 7 389-399.
- 52. LÓPEZ-BOJÓRQUEZ, L. N.; DEHESA, A. Z.; REYES-TERÁN, G. (2004) **Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock.** *Arch Med Res.* Nov-Dec;35(6):465-79.
- 53. MAITRA, S. R.; GESTRING, M. L.; ELMAGHRABI, M. R.; LANG, C. H.; HENRY, M. (1999). Endotoxin induced alterations in hepatic glucose-6-phosphatase activity and gene expression. *Mol Cell Bioch* 196, 79–83.
- 54. McCALLUM, R. E. (1981). Hepatocyte-Kupffer cell interactions in the inhibition of hepatic gluconeogenesis by bacterial endotoxin. *Prog Clin Biol Res.*;62:99–113.
- 55. MIAO, H.; ZHANG, Y.; LU, Z.; LIU, Q.; GAN, L. (2012). **FOXO1** involvement in insulin resistance-related pro-inflammatory cytokine production in hepatocytes. *Inflamm Res.* 61(4):349-58.
- 56. MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D.E.; TSUKUMO, D.M.; ANHE, G.; AMARAL, M.E.; TAKAHASHI, H.K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H.C.; CARVALHEIRA, J.B.; BORDIN, S.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci.* Jan 14;29(2):359-70.

- 57. MINOKOSHI, Y. HAQUE, M. S. & SHIMAZU, T. (1999) Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* 48 287-291.
- 58. MINOKOSHI, Y.; ALQUIER, T.; FURUKAWA, N.; KIM, Y. B.; LEE, A.; XUE, B.; MU, J.; FOUFELLE, F.; FERRE, P.; BIRNBAUM, M. J.; *et al.* (2004) **AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus.** *Nature* **428 569-574.**
- 59. MIZOCK, B. A. (1995). Alterations in carbohydrate metabolism during stress: a review of the literature. *J. Am Medic* 98, 75–84.
- 60. MIZOCK, B. A. (2001). Alterations in fuel metabolism in critical illness: hyperglycemia.Best Practice and Research Clinical Endocrinolology and Metabolism. J. Am Medic .15, 533–551.
- 61. MOREIRA, A.P.; TEXEIRA, T.F.; FERREIRA, A.B.; PELUZIO, M.D.O.C.; ALFENAS, R.D.E. C. (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr.* 108(5):801-9.
- 62. MORRISON, C. D. (2008) Leptin resistance and the response to positive energy balance. *Physiol Behav* 94 660-663.
- 63. MORTON, G. J. (2007) Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *J Physiol* 583 437-443.
- 64. MUNZBERG, H.; FLIER, J. S. & BJORBAEK, C. (2004) Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145 4880-4889.
- 65. MUZIO, M.; BOSISIO, D.; POLENTARUTTI, N.; D'AMICO, G.; STOPPACCIARO, A.; MANCINELLI, R.; VAN'TVEER, C.; PENTON-ROL, G.; RUCO, L. P.; ALLAVENA, P.; et al. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164 5998-6004.
- 66. NAMKOONG, C. (2005). Enhanced hypothalamic AMP-activated protein kinase activity contributes to hyperphagia in diabetic rats. *Diabetes.* vol. 54, no.1, p.63-68.
- 67. NISWENDER, K. D. & SCHWARTZ, M. W. (2003). Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol* 24 1-10.
- 68. NOGUEIRAS, R.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; WOODS, S. C. & TSCHOP, M. H. (2008). **The endocannabinoid system and the control of glucose homeostasis.** *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1 147-151.

- 69. OBICI, S.; ZHANG, B. B.; KARKANIAS, G. & ROSSETTI, L. (2002). **Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production.** *Nat Med* 8 1376-1382.
- 70. OSTUNI, R.; ZANONI,I.; GRANUCCI, F. (2010). **Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling**. *Cell. Mol. Life Sci.* Vol.67 p.4109–4134.
- 71. PARK, S.; HONG, S. M.; SUNG, S. R. & JUNG, H. K. (2008). Long-term effects of central leptin and resistin on body weight, insulin resistance, and beta-cell function and mass by the modulation of hypothalamic leptin and insulin signaling. *Endocrinology* 149 445-454.
- 72. PASCOE, W. S.; SMYTHE, G. A.; STORLIEN, L. H. (1989). **2-deoxy-D-glucose-induced hyperglycemia: role for direct sympathetic nervous system activation of liver glucose output.** *Brain Res.* Vol.25 No.1 p.23-28.
- 73. PHILLIPS S.M. (2010). Out-**FOX(O)ing proteolysis in sepsis**. *J Physiol.* 15;588. 8:1193.
- 74. POCAI, A.; LAM, T. K.; GUTIERREZ-JUAREZ, R.; OBICI, S.; SCHWARTZ, G. J.; BRYAN, J.; AGUILAR-BRYAN, L. & ROSSETTI, L. (2005). **Hypothalamic K(ATP)** channels control hepatic glucose production. *Nature* 434 1026-1031.
- 75. RAMADOSS, P.; UNGER-SMITH, N. E.; LAM, F. S.; & HOLLENBERG, A. N. (2009). STAT3 Targets the Regulatory Regions of Gluconeogenic Genes in Vivo. *Mol Cell Endocrinol.* 23: 827–837.
- 76. RIZK, N. M.; STAMMSEN, D.; PREIBISCH, G.; ECKEL, J. (2001). Leptin and tumor necrosis factor-alpha induce the tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription proteins in the hypothalamus of normal rats in vivo. *Endocrinology.* N.142 vol.7 p.3027-32)
- 77. ROH, M. S.; EKMAN, L.; JEEVANANDAM, M.; BRENNAN, M. F. (1984). Gluconeogenesis in tumor-influenced hepatocytes. *J Surg Res* 96(2):427-34.)
- 78. ROMAN, E. A.; REIS, D.; ROMANATTO, T.; MAIMONI, D.; FERREIRA, E. A.; SANTOS, G. A.; TORSONI, A. S.; VELLOSO, L. A.; TORSONI. M. A. (2010). Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 alpha activation by hypothalamic Pl3K-dependent mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 15;314(1):62-9.
- 79. RONNETT, G. V.; RAMAMURTHY, S.; KLEMAN, A. M.; LANDREE, L. E. & AJA, S. (2009). **AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection.** *J Neurochem* 109 1 17-23.
- 80. ROPELLE, E. R. *et al.* (2007). A Central Role for Neuronal Adenosine 5 Monophosphate-Activated Protein Kinase in Cancer-Induced Anorexia. *J. Endocrinol*. vol.148. no.11. p. 5220–5229.

- 81. RUDERMAN, N. e PRENTKI, M. (2004). **AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome.** *Nat. Rev. Drug Discov.* Vol. 03, no.4, p.340-351.
- 82. SCHWARTZ, M.W. (2000). **Central nervous system control of food intake.** *Nature*, vol. 04, no1. p.661-671.
- 83. SEO, S.; JU, S.; CHUNG, H.; LEE, D. & PARK, S. (2008). Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *J. Endocr* 55 867-874.
- 84. SHIRAI, T.; INOUE, E.; ISHIMI, Y.; YAMAUCHI, J. (2011). AICAR response element binding protein (AREBP), a key modulator of hepatic glucose production regulated by AMPK in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 22.414(2) p:287-91.
- 85. SHIUCHI, T.; HAQUE, M. S.; OKAMOTO, S.; INOUE, T.; KAGEYAMA, H.; LEE, S.; TODA, C.; SUZUKI, A.; BACHMAN, E. S.; KIM, Y. B. *et al.* (2009). **Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system.** *Cell Metab* 10 466-480.
- 86. SHOELSON, S. E.; LEE, J. & GOLDFINE, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116 1793-1801.
- 87. STOPPA, G. R.; CESQUINI, M.; ROMAN, E. A.; PRADA, P. O.; TORSONI, A. S.; ROMANATTO, T.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. & TORSONI, M. A. (2008). Intracerebroventricular injection of citrate inhibits hypothalamic AMPK and modulates feeding behavior and peripheral insulin signaling. *J Endocrinol* 198 157-168.
- 88. SU, R. & CHAO, Y. *et al.* (2007). **5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside** sensitizes TRAIL- and TNF α -induced cytotoxicity in colon cancer cells through AMP-activated protein kinase signaling. *Mol Cancer Ther.* Vol. 6 p.1562-1571.
- 89. TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2005). **Toll-like receptors in innate immunity.** *Int Immunol* 17 1-14.
- 90. THORENS, B. (2011). Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism* Vol. 13 (Suppl. 1): 82-88.
- 91. TODA, C.; SHIUCHI, T.; LEE, S.; YAMATO-ESAKI, M.; FUJINO, Y.; SUZUKI, A.; OKAMOTO, S. & MINOKOSHI, Y. (2009). Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues. *Diabetes* 58 2757-2765.
- 92. TREEBAK, J. T. et al. (2006). AMPK-Mediated AS160 Phosphorylation in Skeletal Muscle Is Dependent on AMPK Catalytic and Regulatory Subunits. DIABETES, VOL. 55. 2051-2060.

- 93. TWEEDELL, A. et al. (2011). Metabolic response to endotoxin in vivo in the conscious mouse: role of interleukin -6. Met. Clin. Experimental. Vol.60 p.92–98.
- 94. VELLOSO, L. A. (2006). O controle hipotalâmico da fome e da termogênese: implicações no desenvolvimento da obesidade. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* vol.50, no.2, p.165-176.
- 95. VELLOSO, L. A.; TORSONI, M. A.; ARAUJO, E. P. (2009). **Hypothalamic dysfunction in obesity**. Rev Neurosci. 20(5-6):441-9.
- 96. WALTNER-LAW, M.; DANIELS, M. C.; SUTHERLAND, C.; GRANNER, D. K. (2000). NF-kappa B inhibits glucocorticoid and cAMP-mediated expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem*;275:31847-31856).
- 97. WANG, R. et al. (2011). Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *j Clinical Investigation*. Vol. 121 N. 11
- 98. WELLEN, K. E. & HOTAMISLIGIL, G. S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115 1111-1119.
- 99. WOODS, S. C.; SEELEY, R. J. & COTA, D. (2008) Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. *Annu Rev Nutr* 28 295-311.
- 100. WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. (2006) MTOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471–484.
- 101. XIAOLU, D.; JING, P.; FANG, H.; LIFEN, Y.; LIWEN, W.; CILIU, Z.; FEI, Y. (2011). Role of p115RhoGEF in lipopolysaccharide-induced mouse brain microvascular endothelial barrier dysfunction. *Brain Res.* 28;1387:1-7.
- 102. YANG, Y. M.; HAN, C. Y.; KIM, Y. J.; KIM, S. G. (2010). **AMPK-associated signaling to bridge the gap between fuel metabolism and hepatocyte viability.** *World J Gastroenterol. Vol.* 16. N.30 p.3731-3742.
- 103. YANG, S.Q.; LIN, H.Z.; MANDAL, A.K.; HUANG, J.; DIEHL, A.M. (2001). **Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology.** *Hepatology.* 34(4 1):694-706.
- 104. YAMAWAKI, Y., KIMURA, H., HOSOI, T., OZAWA, K., 2010. **MyD88 plays a key role in LPS-induced Stat3 activation in the hypothalamus.** Am. J. phys. Regul, integr comp physiol. 298, R403-410.
- 105. YERKOVICH, S. T.; RIGBY, P. J.; FOURNIER, P. A.; OLYNYK, J. K.; YEOH, G. C. (2004). Kupffer cell cytokines interleukin-1beta and interleukin-10 combine to

- inhibit phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis in cultured hepatocytes. *J Biochem Cell Biol.* 36(8):1462-72.
- 106. ZHANG, X.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; KARIN, M.; BAI, H. & CAI, D. (2008) Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135 61-73.
- 107. ZHOU, Q.H.; BOADO, R.J.; HUI, E.K.; LU, J.Z.; PARDRIDGE, W.M. (2011)**Brain-penetrating tumor necrosis factor decoy receptor in the mouse.** *Drug Metab Dispos*.39(1):71-6.

11. ANEXO 1: Autorização de uso animal: Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP - Nº: 2517-1.





Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "MODULAÇÃO DO METABOLISMO HEPÁTICO DA GLICOSE PELA ATIVAÇÃO DE VIAS INFLAMATÓRIAS: A PARTICIPAÇÃO DAS PROTEÍNAS AMPK E TOLL LIKE RECEPTOR (TLR4) HIPOTALÂMICAS" (protocolo nº 2517-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni / Gustavo Aparecido dos Santos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 21 de setembro de 2011.

Campinas, 21 de setembro de 2011.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo

Presidente

Fátima Alonso

Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/

12. ANEXO 2: Submissão do artigo científico na revista Molecular and Cellular Endocrinology.

De: "William Rainey" < mcejournal@med.umich.edu >

Assunto: Editor handles MCE-D-13-00089 Data: 26 de fevereiro de 2013 17:42:47 BRT

Para: marcio.torsoni@fca.unicamp.br

Ms. Ref. No.: MCE-D-13-00089

Title: Hypothalamic AMPK activation blocks lipopolysaccharide inhibition of glucose production in mice liver Molecular and Cellular Endocrinology

Dear Dr. Marcio Alberto Torsoni,

Your submission entitled "Hypothalamic AMPK activation blocks lipopolysaccharide inhibition of glucose production in mice liver" will be handled by Managing Editor William E. Rainey.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is http://ees.elsevier.com/mce/.

Your username is: marcio.torsoni@fca.unicamp.br
If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/mce/automail query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System Molecular and Cellular Endocrinology

For further assistance, please visit our customer support site at http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.