SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Larissa Sayuri Kato

"ALTERAÇÕES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE DISLIPIDÊMICOS: PARTICIPAÇÃO DA AMPK E DO CANAL DE POTÁSSIO MITOCONDRIAL SENSÍVEL AO ATP"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Larissa Sayuri Kato
Helena C. Oliveira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

K156a

Kato, Larissa Sayuri, 1984-
Alterações do metabolismo energético de camundongos geneticamente dislipidêmicos: participação da AMPK e do canal mitocondrial sensível ao ATP / Larissa Sayuri Kato. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Helena Coutinho Franco de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hipoalfalipoproteinemias. 2. Hipercolesterolemia. 3. Hipertrigliceridemia. 4. Proteína quinase ativada por AMP. 5. Acetil-CoA carboxilase. I. Oliveira, Helena Coutinho Franco de, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Changes in energy metabolism in genetically dyslipidemic mice: involvement of AMPK and mitochondrial potassium channel sensitive to ATP
Palavras-chave em Inglês:
Hypoalphalipoproteinemias
Hypercholesterolemia
Hypertriglyceridemia
AMP-activated protein kinase
Acetyl-CoA carboxylase
Área de concentração: Fisiologia
Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular
Banca examinadora:
Helena Coutinho Franco de Oliveira [Orientador]
Eliana Cotta de Faria
Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
Data da defesa: 29-11-2011
Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 29 de novembro de 2011

BANCA EXAMINADORA

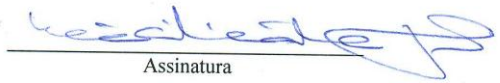
Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes



Assinatura

Profa. Dra. Eliana Pereira de Araujo

Assinatura

Prof. Dr. Luiz Fernando de Rezende

Assinatura

"A coragem de crer em si
determina onde você pode chegar"

Evaldo Ribeiro

Dedico mais essa conquista à minha família,
em especial aos meus pais, Tatsuo e Etsuko,e
ao meu irmão, Daniel, que me ensinam, apóiam e
incentivam, todos os dias, a viver com dignidade, fé e perseverança.
Amo vocês!

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Metabolismo de Lípides da Divisão de Fisiologia e Biofísica, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Unicamp com auxílios financeiros da FAPESP (processos 08/56495-0 e 06/59786-0), CNPq (processo 304532/2010-0), INCT-Obesidade e Diabetes (CNPq e FAPESP), CAPES- PROEX- Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular da Unicamp

AGRADECIMENTOS

A professora Dra Helena Coutinho Franco de Oliveira pela orientação, pelos ensinamentos técnicos e científicos e, principalmente, por me ensinar a acreditar no meu potencial.

A minha família por ser a base de tudo. Independente das minhas escolhas e da distancia física, sempre estão ao meu lado, me apoiando e incentivando. Amo vocês.

Ao meu namorado pelo amor, carinho, sinceridade, companheirismo, dedicação, conselhos, idéias, por me ajudar e apoiar em tudo. Muito obrigada, morah!

Aos professores Dr. Everardo Magalhães Carneiro e Dr. Antonio Carlos Boschero pela estrutura e contribuição necessárias para o desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas do Laboratório 15: Helena Raposo, Gabriel Dorighello, Adriene Paiva, Juliana Rovani, Janaína Christovam, Bárbara Borti, Maricene Sabha, Patrícia Patrício e aos colegas do Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, laboratório 14.

Ao Luiz Fernando da Silva Batista, sem você não teria conseguido tanta força e determinação para desenvolver este projeto, muito obrigada, Balbs!

Aos colegas, em especial a Dra Érika Anne, do Laboratório de Sinalização Celular do professor Dr. Lício Augusto Veloso pela estrutura, suporte científico e pela amizade.

Ao professor Dr Márcio Alberto Torsoni por contribuir para elaboração do projeto e escolha das metodologias.

Aos professores doutores Fernanda Ortis, Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes e Luiz Fernando de Rezende pela análise crítica do trabalho na qualificação.

As professoras Dra Lucia Nassi Castilho e Dra Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos por terem me apresentado, apoiado e incentivado a carreira acadêmica e por toda a ajuda não só intelectual e técnica, mas também pela amizade e pelo carinho.

A professora Dra Eliana Cotta de Faria, Mirian Danellon, Maria Aparecida (Cidinha) e colegas da Divisão de Bioquímica do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clinicas da Unicamp pelo apoio intelectual, técnico e cientifico.

As minhas irmãs de coração: Fernanda Dutra Santiago Bassora, Aline Urban Paffaro e Rafaela Jorge Trad e meus irmãos de coração: Bruno Oliveira Cardoso e Marcelo P C C Lima, pelas risadas, lágrimas, conversas, broncas, carinho e pela sincera amizade de todas as horas.

Aos amigos Tatiane Berti, Fernando Lopes e Jansen José pela amizade ao longo de tantos anos, por compartilharem comigo tantos momentos importantes de nossas vidas.

A todos os amigos, novos e antigos, que contribuíram com seus conselhos, sorrisos, palpites, conhecimentos, solidariedade e carinho.

A Deus pela vida e pelas oportunidades de crescimento e aprendizagem.

"E não importa para onde vamos seguindo, entre nós sempre haverá a lembrança de um olhar, de um carinho e da integridade de momentos sinceros."

Mário Quintana

SUMÁRIO

SUMÁRIO ---- I

RESUMO ---- 3

ABSTRACT ---- 5

LISTA DE ABREVIATURAS ---- 7

INTRODUÇÃO ---- 9

Metabolismo de lipoproteínas e aterosclerose ---- 9

Dislipidemias ---- 12

Síndrome Metabólica: conceito e epidemiologia ---- 13

Controle do balanço energético ---- 15

Via de sinalização da AMPK (proteína quinase ativada por AMP) ---- 16

JUSTIFICATIVA ---- 22

Animais hipoalfalipoproteinêmicos (redução de HDL-colesterol) pela super-expressão da proteína de transferência de colesteril éster (CETP): ---- 22

Animais hipercolesterolêmicos por knockout do receptor de LDL (LDLR0): ---- 23

Animais hipertrigliceridêmicos por super-expressão da apo CIII: ---- 23

OBJETIVOS ---- 25

MATERIAIS E MÉTODOS ---- 26

Animais geneticamente modificados ---- 26

Análises bioquímicas plasmáticas ---- 27

Atividade da CETP no plasma ---- 27

Western Blot para AMPK e ACC total e fosforiladas ---- 28

Taxa de produção de CO_2 *in vivo* ---- 29

Composição química da carcaça ---- 29

Canal mitocondrial de potássio sensível ao ATP (mitoKATP) ---- 29

Análise Estatística ---- 30

RESULTADOS E DISCUSSÃO ---- 31

Estudo da ativação da AMPK e ACC em tecidos de camundongos geneticamente dislipidêmicos ---- 31

Estudo nos animais hipoalfalipoproteinêmicos (CETP) ---- 31

Estudo nos animais hipercolesterolêmicos (LDLR0) ---- 38

Efeito da alimentação pareada em camundongos hipertrigliceridêmicos ---- 49

CONCLUSÕES ---- 58

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ---------- 60

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS ---------- 68

ANEXOS ---------- 71

RESUMO

O estudo das vias de sinalização envolvidas no metabolismo energético é de grande relevância fisiológica, uma vez que um desequilíbrio da homeostase energética pode resultar em obesidade e/ou síndrome metabólica e aumento da mortalidade por doença cardiovascular. Estudos recentes de nosso grupo em três modelos experimentais que exibem distintos tipos de dislipidemias revelaram alterações significativas da composição corporal, gasto energético e padrão de ingestão alimentar. Neste trabalho estudamos a homeostase energética desses modelos dislipidêmicos avaliando: (1) a expressão e fosforilação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK), um importante regulador do metabolismo energético, bem como de seu alvo, a enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), em fígado e músculo esquelético de camundongos hipoalfalipoproteinêmicos e hipercolesterolêmicos e (2) o efeito da alimentação pareada em animais hipertrigliceridêmicos que apresentam alterações de comportamento alimentar, metabolismo corporal e maior atividade do canal mitocondrial de potássio sensível ao ATP (mitoKATP).

Considerando os animais hipoalfalipoproteinêmicos (transgênicos para CETP), os quais apresentam aumento de gasto energético global, verificamos que estes apresentam redução da massa relativa dos depósitos adiposos quando comparados os controles wild type (WT). O estudo da ativação da AMPK e da ACC mostra que o estado energético dos tecidos muscular e hepático parece não diferir nos animais CETP e WT. Tanto no fígado como no músculo dos animais CETP não houve alteração da massa e do estado de ativação da AMPK e da ACC. Estes resultados sugerem que não ocorrem variações significativas na síntese, armazenamento e "exportação" de lípides no fígado destes animais. Em relação ao músculo sóleo, pode-se concluir que não há alteração de síntese e catabolismo lipídico nos animais CETP. De modo geral, podemos dizer que a sinalização da AMPK não está ativada nestes tecidos e, portanto, que o maior metabolismo corporal observado nestes animais deve estar sendo causado por outros tecidos do organismo, por exemplo, o próprio tecido adiposo.

Em animais machos e fêmeas hipercolesterolêmicas (LDLR0) observamos redução da massa corporal, porém sem alteração significativa da massa relativa dos depósitos adiposos quando comparados aos animais controles wild type. Os resultados sobre ativação da AMPK e da ACC mostram que o estado energético em tecidos periféricos é diferente nos animais LDLR0 e controles (WT). No fígado das fêmeas

hipercolesterolêmicas observamos aumento da ativação da AMPK sem alteração significativa da fosforilação da ACC. Isso significa que não houve inibição da lipogênese ou ativação da beta-oxidação no fígado dos animais hipercolesterolêmicos, embora possa ter havido aumento de catabolismo de outros nutrientes. No músculo sóleo das fêmeas e dos machos não houve alteração de fosforilação de ambas AMPK e ACC. Pode-se então concluir que não há deprivação energética no músculo destes animais.

Considerando o estudo em animais hipertrigliceridêmicos (HTG), quando submetidos ao regime de *paired feeding* (PF) observamos uma redução de 17% no consumo alimentar nas fêmeas e nos machos HTG quando comparados aos HTG alimentados *ad libitum* (ad lib). Isso levou a uma redução significativa do ganho de peso dos HTG-PF comparados aos WT-ad lib, em ambos os sexos. Os animais HTG-PF mantiveram a massa dos depósitos adiposos da carcaça semelhantes aos WT-ad lib e HTG-ad lib. No entanto, o depósito adiposo visceral das fêmeas HTG-ad lib é menor que dos WT-ad lib, enquanto nos machos, os HGT-PF apresentaram maior adiposo visceral que os HTG-ad lib. Quando comparados aos WT-ad lib, verificamos que as fêmeas HTG-PF mantiveram aumento significativo da atividade (abertura) do canal de potássio mitocondrial sensível ao ATP (mitoKATP) e da produção corporal de CO_2. No entanto, nos machos HTG-PF houve fechamento dos mitoKATP, redução da produção de CO_2 e manutenção da massa corporal. Assim, pode-se inferir que o metabolismo corporal (produção de CO_2) reflete o aumento do metabolismo celular causado por aumento da atividade do mitoKATP que desacopla levemente as mitocôndrias e que estas adaptações são revertidas pela restrição alimentar nos machos, mas não nas fêmeas HTG.

ABSTRACT

An imbalance of energy homeostasis can result in obesity and/or metabolic syndrome and increased mortality from cardiovascular disease. Recent studies by our group in three experimental models that exhibit different types of dyslipidemia have shown significant changes in body composition, energy expenditure and food intake. In this work we studied the energy homeostasis in these models through: (1) quantifying the expression and phosphorylation of AMP-dependent protein kinase (AMPK), a key regulator of energy metabolism, as well as its target, the enzyme acetyl-CoA carboxylase (ACC) in liver and skeletal muscle in hypoalphalipoproteinemic and hypercholesterolemic mice and (2) the effect of paired feeding regimen on hypertriglyceridemic mice that present increased food intake, body CO_2 production and increased activity of the mitochondrial potassium channel sensitive to ATP (mitoKATP).

Considering the hypoalphalipoproteinemic mice (transgenic for CETP), which show an increased overall energy expenditure, we found that these mice have reduced relative fat depot mass when compared to wild type controls (WT). Western blot analyses showed that, in both tissues, liver and muscle, there were no changes in mass and state of activation of AMPK and ACC in CETP compared to WT mice. These results suggest that no significant variations in the synthesis, storage and secretion of lipids in the liver of these mice. Regarding the soleus muscle, these results suggest that there is no change in lipid synthesis and catabolism in CETP mice. Overall we may say that AMPK signaling is not activated in liver and muscle tissues and, therefore, that the increased body metabolism observed in these CETP mice must be caused by other body tissues, for example, the adipose tissue itself.

In hypercholesterolemic male and female mice (LDLR0) we observed a reduction in body mass, but no significant change in the relative mass of fat depots when compared to WT. The results on activation of AMPK and ACC show that the liver of LDLR0 females had increased activation of AMPK without significant change in the phosphorylation of ACC. This means that there was no inhibition of lipogenesis and activation of β-oxidation in the liver of hypercholesterolemic mice, although there may have been increased catabolism of other nutrients. In the soleus muscle of females and males there were no changes in the phosphorylation state of both AMPK and ACC. Then, we can conclude that there is no energy deprivation in the muscle of these LDLR0 mice.

Considering the study with hypertriglyceridemic (HTG) mice, when subjected to the paired feeding (PF) we observed a 17% reduction in food intake of females and males when compared to HTG mice fed ad libitum (ad lib). This led to a significant reduction in HTG-PF weight gain compared to WT-ad lib in both sexes. HTG-PF mice retained the mass of carcass fat deposits similar to WT and HTG ad lib. Compared to WT-ad lib, HTG-PF mice maintained significant increased activity (opening) of the mitoKATP and body CO_2 production. These data showed that the regimen of paired feeding in which HTG mice were submitted did not change the high rate body metabolism and mitochondrial resting respiration observed in HTG-ad lib mice. These results suggest that the metabolic adaptation of HTG (higher activity of mitoKATP) is not sensitive to changes in food restriction and compromises the rate of body growth.

LISTA DE ABREVIATURAS

^{14}CCE: ^{14}C-colesteril-éster;

ABCA1: *ATP-binding cassete A1;*

ACC: Acetil-CoA Carboxilase;

ad lib: *ad libitum*;

AGL: Ácidos graxos livres;

AMP: Adenosina monofosfato;

AMPK: Proteína kinase ativada por AMP;

AN: núcleo arqueado;

Apo: apoproteína;

ATP: Adenosina trifosfato;

CaMKK: Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase kinase;

CBS: *cystathionine β synthase*;

CEMIB: Centro de Bioterismo;

CETP: Proteína de transferência de colesteril éster;

COL: Colesterol total;

CPT-1: *Carnitine palmitoyl transferase1;*

DM: Diabetes Melitus;

DNA: Ácido desoxirribonucléico;

EPM: erro padrão da média;

EROS: espécies reativas de oxigênio;

FAS: *fatty acid synthase;*

FH: hipercolesterolêmia familiar;

GAPDH:*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase;*

GLIC: glicemia;

GLUT4: *glucose transporter 4*;

HDL: *High Density Lipoprotein;*

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A;

HTG: Hipertrigliceridêmicos;

IDF: Federação Internacional de Diabetes;

IDL: *Intermediate density lipoprotein*;

IMC: Índice de Massa Corporal;

LDL: *Low Density Lipoprotein;*

LDLR0: *knockout* do receptor de LDL;
LH: lipase hepática;
LKB1: *liver kinase B1;*
LP: lipoproteína;
LPL: lipoproteína lipase;
LRP: *LDL receptor related protein*;
mitoKATP: Canal mitocondrial de potássio sensível ao ATP;
MO25: *mouse protein 25;*
mTOR: *mammalian target of rapamycin*;
NCEP-ATP III: *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III* ;
NCEP-R: *National Cholesterol Education Program Revised;*
OMS: Organização Mundial da Saúde;
pACC: Acetil-CoA Carboxilase fosforilada;
pAMPK: Proteína kinase ativada por AMP fosforilada;
PF: *Paired feeding*; Alimentação pareada;
PKA: proteína quinase A;
PKC: proteína quinase C;
PVN: núcleo paraventricular;
QM: quilomícrom;
R0-F: Fêmeas hipercolesterolêmicas;
R0-M: Machos hipercolesterolêmicos;
Ser: Serina;
SM: Síndrome Metabólica;
SREBP2: *sterol regulatory element binding protein;*
STRAD: *Ste20-related adaptor protein;*
TAB: *TAK binding protein*;
TAK1*: transforming growth factor-b-activated kinase 1*;
TG: Triacilglicerol;
Thr: Treonina;
UCPs: *Uncoupling proteins*;
Vigitel: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico;
VLDL: *Very Low Density Lipoprotein;*
WT: *wild type;*

INTRODUÇÃO

Metabolismo de lipoproteínas e aterosclerose

Os lipídeos são encontrados em todas as células e são importantes na secreção da bile, como precursores de hormônios e vitaminas e são responsáveis pela produção e armazenamento de energia. Os lipídeos são transportados no plasma e na linfa na forma de lipoproteínas (LP) e os principais encontrados no plasma são: colesterol, triacilglicerol, fosfolípides e ácidos graxos não esterificados.

As lipoproteínas são complexos macromoleculares compostos de um núcleo lipídico hidrofóbico (principalmente colesterol esterificado e triacilglicerol) e de uma camada externa única hidrofílica composta principalmente por fosfolípides, colesterol livre e proteínas (apoproteínas- Apo).

As lipoproteínas podem ser classificadas conforme o tamanho da partícula, a composição química, densidade e mobilidade eletroforética (Rifai *et al.*, 1999). Estão descritas seis lipoproteínas plasmáticas de acordo com a densidade e mobilidade eletroforética. As principais classes são: quilomícrons (QM, chylomicrons), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL, very low density lipoprotein), lipoproteína de densidade baixa (LDL, low density lipoprotein) e lipoproteína de densidade alta (HDL, high density lipoprotein); e a lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e a lipoproteína a [Lp(a)] são classificadas como lipoproteínas “especiais”.

Os QM são as maiores lipoproteínas plasmáticas presentes no estado pós-prandial, produzidas pelo intestino, ricas em triacilglicerol (85/ 90%) porém pobres em colesterol livre e fosfolípides. Contem aproximadamente 1/ 2% de proteínas sendo composto por apo B-48, apo A (I, II, IV), apo C (I, II, III) e apo E. A interação dos QM com a lipoproteína lipase (LPL, enzima presente no endotélio vascular) resulta nos remanescentes de quilomícrons que são partículas menores, depletadas de triacilglicerol (Rifai *et al.*, 1999). Esses remanescentes são rapidamente eliminados do plasma pelo fígado através de receptores hepáticos chamados de LRP (*LDL receptor related protein*) (Herz *et al.*,1988; Mahley *et al.*,1998).

As VLDL, menores que os quilomícrons, são compostas de aproximadamente 55% de triacilglicerol, 20% de colesterol, 15% de fosfolípides e 10/ 15% de proteínas, principalmente Apo B-100, Apo C e Apo E. Sua síntese ocorre no fígado (Mahley *et al.*, 1998). Os triacilgliceróis da VLDL são hidrolisados pela LPL e lipase hepática (LH),

tornando as partículas cada vez menores e mais ricas em colesterol. Essas partículas, chamadas de IDL (lipoproteínas de densidade intermediária) são, em grande parte, rapidamente captadas via receptores hepáticos específicos (LRP) e o restante continua circulando, perdendo mais triacilgliceróis, fosfolipídios e apoliporoteínas, transformando-se então em LDL (Ginsberg *et al.*, 2001). As IDLs perdem a maior parte das apolipoproteínas C, no entanto, conservam as apo-B100 e apo-E, deste modo a captação de remanescentes de VLDL e IDL pelos hepatócitos é mediada pela apo-E, e a captação de LDL pelo receptor de LDL é mediada pela apo-B100 (Mahley *et al.*, 1999).

As LDL são responsáveis por aproximadamente 50% da massa lipoprotéica total do plasma humano. Seu diâmetro é bem menor que o QM e VLDL, sendo o colesterol éster responsável por cerca de 2/3 da massa de LDL e 25% de proteína, principalmente de apo-B100. Grande parte de sua absorção tecidual (em torno de 75%) ocorre no fígado.

As HDL podem ser sintetizadas pelo fígado ou pelo intestino através da liberação de partículas contendo apo-A1 chamadas de precursoras de HDL ou HDL nascentes (pré β HDL). Estas partículas são ainda pobres em lipídios e recebem colesterol livre e fosfolípides dos tecidos via interação com transportadores de membrana conhecidos como ABCA1 (*ATP-binding cassete A1*) (Oram *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2009). A HDL madura, constituída por 50% de proteína, 20% de colesterol na forma livre e esterificada, 30% de fosfolípides e somente traços de triacilglicerol, adquire colesterol das células e o transporta para o fígado para ser excretado ou para outras células que necessitam de colesterol (Mahley *et al.*, 1999).

Uma vez dentro da célula, o colesterol derivado das LP exerce várias ações regulatórias, incluindo a repressão da HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase), enzima que catalisa a etapa limitante da biossíntese do colesterol, e da transcrição do gene do receptor da LDL. Desta forma, as células se protegem de um aumento excessivo da concentração de colesterol. Por outro lado, na deprivação de colesterol, as células aumentam a expressão da HMG-CoA redutase, estimulando a síntese de novo de colesterol, e aumentam também a expressão dos receptores de LDL, promovendo captação do colesterol exógeno (Brown e Goldstein, 1986).

As alterações lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico (Rifai *et al.*, 1999) como, elevação das concentrações de LDL e diminuição de HDL são fatores de risco primários para o desenvolvimento da aterosclerose (NCEP, 2001).

Define-se atualmente a aterosclerose coronariana como sendo o resultado da interação de múltiplos processos associados a dislipidemia, injúria do endotélio e reposta inflamatória, fatores estes que levam a um conjunto de modificações da camada íntima arterial (Schwartz *et al.*, 1993). O dano ao endotélio constitui um evento fundamental na fase inicial da aterosclerose. O aumento do tempo de permanência das lipoproteínas no compartimento plasmático, que ocorre nas hiperlipidemias, pode facilitar a oxidação dessas partículas.

A LDL penetra na parede vascular através do endotélio e pode sofrer alterações químicas como oxidação e proteólise. A LDL pode ser modificada por espécies reativas de oxigênio (EROS), oxigênio molecular, compostos químicos endógenos ou exógenos *in vitro e in vivo*. Estudos demonstram que produtos de oxidação de colesterol, gerados pela modificação oxidativa da LDL, os hidroperóxidos de colesterol, conferem citotoxicidade à partícula e são relevantes para patogênese e progressão da aterosclerose (Chilsom e Steinberg, 2000).

A LDL modificada estimula a expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais que farão com que células mononucleares infiltrem no espaço subendotelial estimulando a infiltração de monócitos e proliferação e migração de células musculares lisas (Chien *et al.*, 2003). Estas células mononucleares irão se transformar em células espumosas (*foam cells*), pois apresentam receptores que reconhecem as LDL modificadas (receptores *scavenger*), mas que não são regulados pela entrada de colesterol na célula. Estas células (monócitos) passam a secretar várias citocinas, como por exemplo, os fatores de crescimento que levam à proliferação celular e produção da matriz extracelular, formando a chamada *fatty streak* que representa o estágio inicial da placa de ateroma, a qual evolui diminuindo a luz da artéria (Ross *et al.*, 1993, Fan e Watanabe 2003). A ruptura da placa aterosclerótica, com conseqüente instalação de um trombo no local é a principal causa das síndromes coronarianas agudas (Libby *et al.*, 2011).

Dislipidemias

As dislipidemias são alterações lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo das lipoproteínas (Quintão *et al.*, 2011). As principais dislipidemias podem ser classificadas em: hipercolesterolemia isolada (aumento sérico do colesterol total e/ou do colesterol da LDL); hipertrigliceridemia isolada (aumento dos triacilgliceróis); hiperlipidemia mista (aumento do colesterol e dos triacilgliceróis) e diminuição isolada do colesterol de HDL (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2001).

A hipercolesterolemia familiar humana (FH) é uma doença autossômica dominante, relativamente comum, causada por mutações no gene do receptor da LDL. Essas mutações resultam em mau funcionamento (afetam a capacidade do receptor para ligar seus ligantes em lipoproteínas ou mutações em receptores que se ligam normalmente, mas não são capazes de internalizar a lipoproteína) ou ausência do receptor, levando a elevação das concentrações plasmáticas de LDL e colesterol total. Indivíduos heterozigotos para a FH ocorrem com uma freqüência de cerca de 1 em 500 na população e são encontrado em muitos grupos étnicos. Normalmente apresentam concentrações de colesterol plasmático que são duas a três vezes acima da média (maior que 300 mg/dL) e concentrações de LDL maiores que 250 mg/dL. Indivíduos homozigotos para FH são raros, ocorrendo na freqüência de cerca de 1 em 10^6 na população. Apresentam concentrações de colesterol de três a seis vezes acima da média (variação de 600 a 1000 mg/dL) e de concentrações de LDL-colesterol de 550 a 950 mg/dL (Hobbs *et al.*, 1992; Mahley *et al.*, 1999, Quintão *et al.*, 2011).

A hipertrigliceridemia é caracterizada pelo aumento das concentrações plasmáticas VLDL, que causam elevações da concentração de triacilgliceróis totais plasmáticos. A hipertigliceridemia parece ser causada pela superprodução de VLDL na presença de produção, aparentemente normal, de apo-B, o que leva à secreção de grandes VLDL ricas em triacilgliceróis. Distúrbios secundários (resistência à insulina, por exemplo) que levam à produção excessiva de VLDL podem exacerbar a síndrome (Mahley *et al.*, 1999, Quintão *et al.*, 2011).

A hipoalfalipoproteinêmia é uma desordem autossômica dominante e manifesta-se por baixos níveis plasmáticos de HDL (menos de 40 mg/dL) e um risco aumentado para doença coronária prematura. Os defeitos genéticos e metabólicos que levam a baixos níveis de HDL no plasma são muito variados, como por exemplo, alterações genéticas no receptor ABCA1 e na ApoA1 (Mahley *et al.*, 1999, Quintão *et al.*, 2011).

Diversos estudos demonstram que a obesidade está relacionada com hipertrigliceridemia, hipertensão, redução de HDL-colesterol, intolerância à glicose e/ou resistência à insulina (Ten *et al.*, 2004, Alberti *et al.*, 2009, Catenacci *et al.*, 2009).

Síndrome Metabólica: conceito e epidemiologia

A síndrome metabólica (SM), antigamente conhecida como síndrome X, é a combinação de anormalidades metabólicas que são fatores de risco para doenças cardiovasculares. Diferentes definições foram propostas para a SM (Tabela 1). A primeira delas em 1998, da Organização Mundial da Saúde (OMS), considera a resistência insulínica como fator indispensável a seu diagnóstico; a segunda definição foi elaborada posteriormente pelo National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III, 2001) e, por apresentar maior aplicabilidade clínica, é utilizada na maioria dos estudos. Em 2004, essa mesma definição passou por uma revisão gerando o NCEP-R, e no ano seguinte, a Federação Internacional de Diabetes (IDF) propôs nova definição, na qual a presença de gordura visceral torna-se o principal fator diagnóstico.

Tabela 1. Definições da síndrome metabólica

OMS, 1998 (Alberti *et al.*, 1998)	1. Alteração da homeostase da glicose (tolerância alterada à glicose ou glicemia de jejum alterada) ou DM e/ou resistência à insulina 2. Duas ou mais das seguintes condições: a. pressão arterial ≥ 160/90 mmHg b. trigliceridemia ≥ 150 mg/dL e/ou nível de HDL < 35 mg/dL para homens e < 39 mg/dL para mulheres c. obesidade central (índice cintura/quadril > 90cm para homens e > 85cm para mulheres) ou índice de massa corporal (IMC) > 30 kg/m^2 d. microalbuminúria (taxa de excreção urinária de albumina ≥ 20 mcg/min ou índice albumina/creatinina ≥ 20 mg/g)
NCEP-ATPIII, 2001 (Expert Panel. JAMA, 2001)	1. Três ou mais das seguintes condições: a. obesidade central (circunferência abdominal > 102 cm para homens e > 88 cm para mulheres) b. trigliceridemia ≥ 150 mg/dL c. níveis de HDL < 40 mg/dL para homens e < 50 mg/dL para mulheres

	d. pressão arterial ≥ 130/85 mmHg e. glicemia de jejum ≥ 110 mg/dL
NCEP-R, 2004 (Grundy *et al.*, 2004)	1. Três ou mais das seguintes condições: a. obesidade central (circunferência abdominal > 102 cm para homens e > 88 cm para mulheres) b. trigliceridemia ≥ 150 mg/dL ou tratamento específico para essa anormalidade lipídica c. níveis de HDL < 40 mg/dL para homens e < 50 mg/dL para mulheres ou tratamento específico para essa anormalidade lipídica d. pressão arterial ≥ 130/85 mmHg ou tratamento específico para hipertensão previamente diagnosticada e. glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL ou tratamento com drogas para aumento de glicose.
IDF, 2005 e 2006 (Alberti *et al.*, 2005 e 2006)	1. Obesidade central (circunferência abdominal ≥ 94 cm para homens europeus ou ≥ 88 cm para mulheres européias) Valores específicos devem ser usados para outros grupos étnicos 2. Duas ou mais das seguintes condições: a. trigliceridemia ≥ 150 mg/dL ou tratamento específico para essa anormalidade lipídica b. níveis sangüíneos de HDL < 40 mg/dL para homens ou < 50 mg/dL para mulheres, ou tratamento específico para essa anormalidade lipídica c. pressão sistólica ≥ 130 mmHg ou pressão diastólica ≥ 85 mmHg, ou tratamento específico para hipertensão previamente diagnosticada d. glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL, ou diagnóstico prévio de DM tipo II

OMS: Organização Mundial da Saúde, NCEP-ATPIII: National Cholesterol Education Program- Adult Treatment Panel III, NCEP-R: National Cholesterol Education Program- Adult Treatment Panel III Revised, IDF: International Diabetes Federation; DM: diabetes melito, HDL: High Density Lipoprotein. Outras referências: Steemburgo et al, 2007; Benetos et al, 2008; Teixeira et al, 2007.

Dados epidemiológicos da SM são geralmente de difícil obtenção, uma vez que a definição da síndrome é variável. A prevalência pode variar de 10 a 22% conforme as definições adotadas em uma mesma população francesa (Benetos *et al.*, 2008). Para residentes norte-americanos, a prevalência de SM está estimada em 47 milhões de indivíduos com uma distribuição ajustada pela idade de maneira semelhante entre homens (24%) e mulheres (23%) (Bentley-Lewis *et al.*, 2007). Ginter e colaboradores estimam que, na população geral de países desenvolvidos, a prevalência de SM chegue a

40% da população adulta (Ginter *et al.*, 2008). Segundo a IDF, a obesidade abdominal é uma condição obrigatória da síndrome metabólica. No caso da obesidade, dados sobre sua prevalência são abundantes. A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 1,7 bilhões de pessoas ao redor do mundo apresentem sobrepeso e 310 milhões sejam obesas (Bessesen, 2008). Nos Estados Unidos cerca de dois terços dos adultos encontram-se acima do peso e 28% dos homens e 34% das mulheres são obesos. No Reino Unido, aproximadamente 45% das mulheres e 30% dos homens estão acima do peso e na Inglaterra cerca de um quarto são obesos (James, 2004 e Hession *et al.*, 2008). No Brasil, dados da pesquisa de Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (Vigitel- Ministério da Saúde, Brasil, 2010) indicam que na população adulta (≥ 18 anos) a prevalência de obesidade (IMC ≥ 30 kg/m^2) é de 14,4% em homens e 15,5% em mulheres e o excesso de peso (IMC ≥ 25 kg/m^2) em homens é de 52,1% e 44,3% em mulheres.

Controle do balanço energético

A obesidade é resultado de um desequilíbrio da homeostase energética pela diferença entre a quantidade de energia obtida pelo indivíduo através dos alimentos e a energia gasta para a manutenção do seu metabolismo basal, realização de atividades físicas e termogênese adaptativa (Speakman *et al.*, 2004; Spiegelman *et al.*, 2001). Nas últimas décadas, várias proteínas sistêmicas e intracelulares, em diferentes órgãos, foram apontadas como determinantes do controle do balanço energético, o qual pode ser dividido em central e periférico.

O controle do balanço energético central envolve diversos neurohormônios anorexigênicos e orexigênicos. Esses diversos e complexos sinais convergem nos neurônios da região hipotalâmica do núcleo arqueado (AN, arcuated nucleus) e núcleo paraventricular (PVN) (Folmes *et al.*, 2007), de onde são desencadeadas as sinalizações para as repostas periféricas e comportamentais.

O controle periférico pode ser exercido por diversos hormônios que ativam o metabolismo (catecolaminas, hormônios da tireóide, etc), bem como pela atividade de proteínas intracelulares determinantes das vias de anabolismo e catabolismo. Com relação à dissipação de energia, merecem destaque as vias ativadas pelos receptores adrenérgicos, as proteínas desacopladoras (UCPs) e proteínas reguladoras de enzimas chaves das reações catabólicas, como a proteína kinase ativada por AMP (AMPK).

Via de sinalização da AMPK (proteína quinase ativada por AMP)

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) participa da regulação do suprimento energético e vias de geração de energia em resposta à necessidade metabólica da célula. Foi descrita pela primeira vez em 1973, no entanto as pesquisas sobre ela tiveram maior avançao em 1994, quando a subunidade catalítica de mamíferos foi clonada. Um interesse maior surgiu quando os primeiros resultados indicaram que a AMPK pode regular a expressão gênica e ser um importante alvo terapêutico para o diabetes, câncer e obesidade (Rutter *et al.*, 2008, Mantovani *et al.*, 2011).

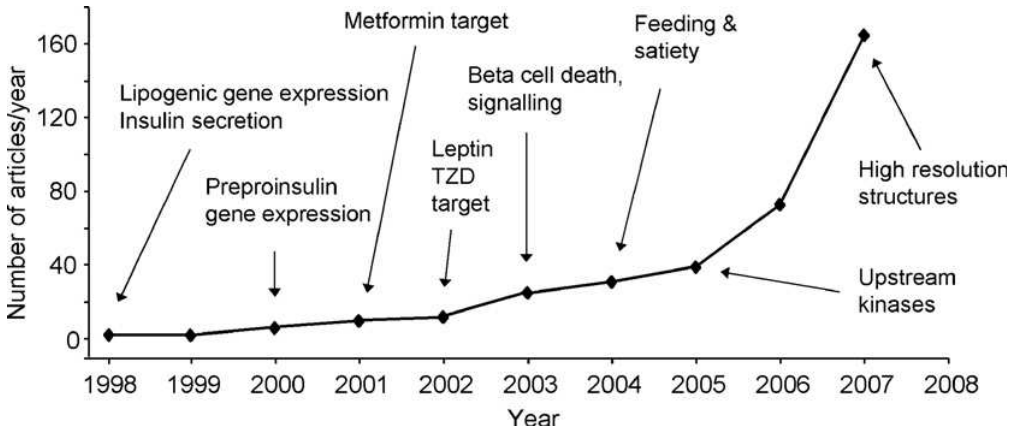


Figura 1. Cronologia do estudo da AMPK (retirado de Rutter *et al.*, 2008).

AMPK é um complexo protéico heterotrimérico composto por uma subunidade α (α1 e α2), uma subunidade β (β1 e β2) e uma subunidade γ (γ1, γ2 e γ3), cada uma codificada por um gene diferente (Rutter *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2007, Townley *et al.*, 2007, Canto *et al.*, 2010; Gormand *et al.*, 2011). A subunidade α é a subunidade catalítica a qual contem o domínio quinase, e entre os diferentes sítios de fosforilação, a treonina 172 deve ser fosforilada para conferir a atividade da AMPK. A subunidade β serve principalmente como o núcleo estrutural da proteína através de interações com as subunidades α e γ, além de possuir um domínio com afinidade para glicogênio. A subunidade regulatória γ é o componente funcional central responsável pela resposta ao AMP, pois sua ligação ao domínio CBS (cystathionine β synthase) ativa alostericamente a AMPK, tornando-a um melhor substrato para quinases do que para as fosfatases (Arad *et al.*, 2007, Hardie *et al.*, 2007, Osler *et al.*, 2008, Amadeo *et al.*, 2007).

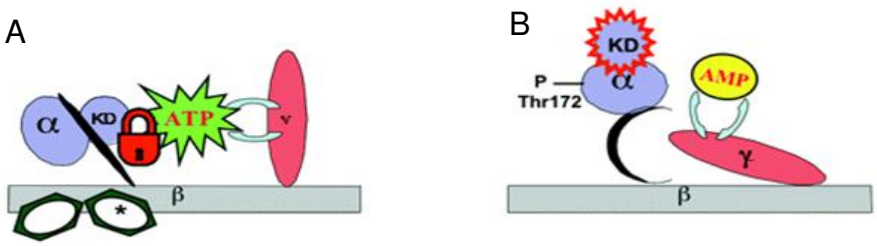


Figura 2. Complexo enzimático da AMPK. (A) Em condições em que não há privação de energia, a enzima está inibida pelo ATP. (B) Em condições de estresse energético, o AMP, abundante, se liga à subunidade γ, gerando uma mudança conformacional, permitindo que ocorra a fosforilação da treonina 172 por quinases *upstream*, levando a ativação da AMPK. KD: domínio quinase. *: domínio de ligação do glicogênio (retirado de Arad *et al.*, 2007).

Foram identificadas três quinases *upstream* que podem ativar a AMPK através da fosforilação da Thr-172 na subunidade catalítica. A LKB1 (*liver kinase B1*) parece ser crucial no controle da glicemia e no metabolismo de lipídios; a CaMKKβ (Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase kinase) é considerada uma quinase *upstream* alternativa e atua em resposta ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+}; e a terceira quinase potencialmente ativadora da AMPK é TAK1 (transforming growth factor-*b*-activated kinase 1) que fosforila a AMPK em fibroblastos de ratos neonatos, mas sua real influência ainda é controversa (Long *et al.*, 2006, Viollet *et al.*, 2009; Rutter *et al.*, 2008; Witczak *et al.*, 2008, Jansen *et al.*, 2009).

Além da fosforilação, a AMPK é ativada alostericamente pelo AMP que se liga a subunidade regulatória γ. Essa ligação induz uma mudança conformacional no domínio quinase a qual protege a AMPK de desfosforilação na Thr-172, provavelmente, catalisada por uma forma da proteína fosfatase 2A ou 2C (Viollet *et al.*, 2009).

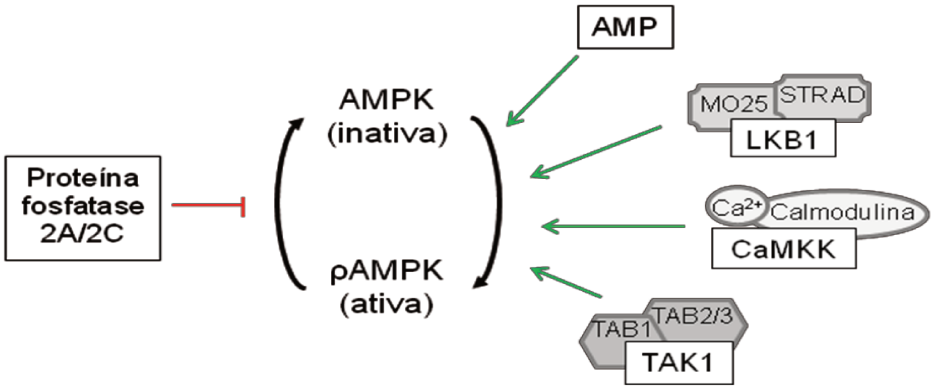


Figura 3. Ativação da AMPK por diferentes mecanismos. Ativação por (setas verdes): (1) regulação alostérica por AMP; (2) fosforilação por LKB1 (liver kinase B1) que junto com a MO25 (mouse protein 25) e a STRAD (Ste20-related adaptor protein) formam um complexo heterotrimérico; (3) fosforilação por CaMKK (Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase kinase); e (4) fosforilação por TAK1 (transforming growth factor-*b*-activated kinase 1) a qual forma um complexo com a TAB1 (TAK binding protein-1) e TAB2 ou TAB3. A inativação (seta vermelha) ocorre através da desfosforilação pela proteína fosfatase 2A ou 2C (adaptado de Lage *et al.*, 2008, Rutter *et al.*, 2008, Witczak *et al.*, 2008, Kahn *et al.*, 2005).

O sistema da AMPK é ativado por qualquer estresse que cause aumento na relação intracelular AMP/ATP, tanto com a produção quanto com consumo de ATP. Esses estímulos são os mais diversos e podem ser fisiológicos, tais como os estados de jejum, exercício físico e contração muscular, ou patológicos, como a hipóxia, estresse oxidativo, choque osmótico, choque térmico, envenenamento metabólico, isquemia, diminuição do pH, inibição da glicólise e desacopladores da fosforilação oxidativa (Santomauro Júnior *et al.*, 2008, Hardie *et al.*, 2011).

Uma vez ativada, a AMPK altera o metabolismo celular, bloqueando vias de anabolismo enquanto ativa o catabolismo, estimulando a captação e oxidação de ácidos graxos, captação de glicose e redução da síntese protéica, a fim de restabelecer relação intracelular AMP/ATP.

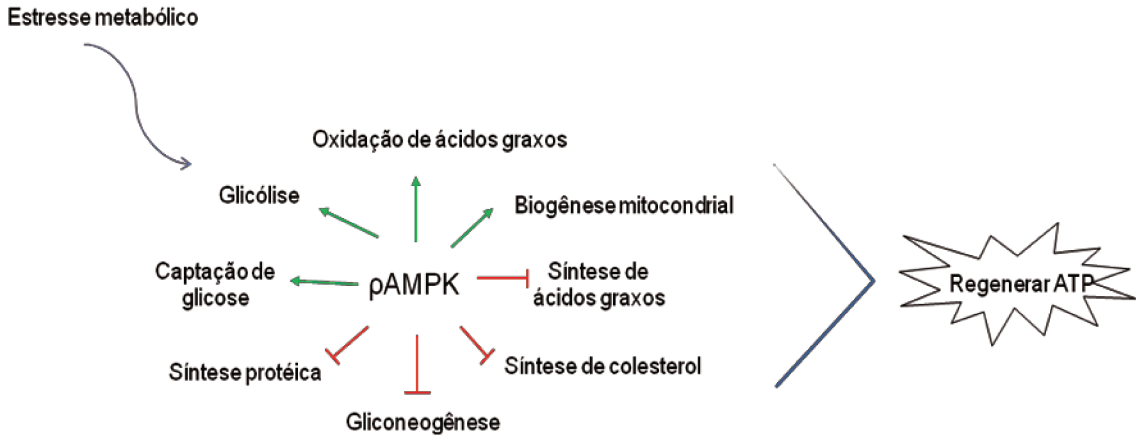
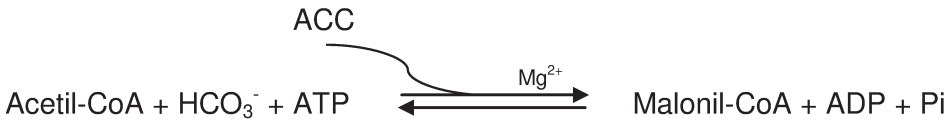


Figura 4. Vias de atuação da AMPK fosforilada. Setas verdes indicam vias de catabolismo, vias que são ativadas, e setas vermelhas indicam vias de anabolismo, vias inibidas pela fosforilação (ativação) da AMPK (Adaptado de Shimmack *et al.*, 2004 e Hardie *et al.*, 2008).

A AMPK coordena mudanças no metabolismo lipídico e, portanto, regula as vias de oxidação e síntese de ácidos graxos. A acetil-CoA carboxilase (ACC), principal enzima na síntese de ácidos graxos, foi um dos primeiros substratos a ser identificado como passível de fosforilação pela AMPK gerando sua inativação.

A ACC foi reconhecida pela primeira vez em 1958 como um importante componente enzimático da via biossintética de ácidos graxos (Thampy *et al.*, 1985) e desde então vem sendo estudada por vários grupos. Essa enzima é crucial, pois catalisa a carboxilação de acetil-CoA para formar malonil-CoA, um substrato essencial no controle da síntese e oxidação de ácidos graxos (Haystead *et al.*, 1988; Ha *et al.*, 1994, Brownsey *et al.*, 2006, Mantovani *et al.*, 2011).



A ACC em mamíferos é expressa como duas isoformas a ACC 265, ACC 1 ou ACCα e a ACC 280, ACC 2 ou ACCβ (Saggerson *et al.*, 2008). A ACCα é expressa de maneira mais abundante em tecidos lipogênicos, como fígado, tecido adiposo branco e glândulas mamárias (Kusunoki *et al.*, 2006), além de ser essencial para o desenvolvimento embrionário em camundongos (Saggerson *et al.*, 2008). O malonil-CoA

procedente da ACCα é utilizado pela FAS (fatty acid synthase) para a síntese de ácidos graxos no citosol (Wakil *et al.*, 2009). Diferentemente, o malonil-CoA gerado pela ACCβ nas proximidades da mitocôndria está primordialmente relacionado com a diminuição da β-oxidação mitocondrial através de inibição da CPT-1 (carnitina palmitoil transferase 1). Sua expressão está aumentada nos tecidos com alto gasto energético como no músculo esquelético e coração, mas também é encontrada no fígado, no tecido adiposo marrom, glândulas mamárias e ilhotas pancreáticas (Saggerson *et al.*, 2008; Kusunoki *et al.*, 2006; Wakil *et al.*, 2009; Schreurs *et al.*, 2010).

Tanto a ACCα quanto a ACCβ podem ser reguladas por interação alostérica ou por fosforilação, como esquematizado na figura 5. A ativação alostérica pode ocorrer por citrato (período pós-prandial), glutamato e outros ácidos carboxílicos, e a inibição por ácidos graxos de cadeia longa ativados, que são freqüentes no jejum e diabetes (Brownsey *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 1997, Munday *et al.*, 2002). A fosforilação da ACC resulta na inibição de sua atividade e pode ser mediada tanto pela AMPK, quanto pela PKA ou PKC (Winder *et al.*, 1997), as quais por sua vez podem ser estimuladas pelo glucagon ou agentes beta-adrenérgicos. Por outro lado, a insulina também pode regular a ACC direta (Heesom *et al.*, 1998) ou indiretamente, inibindo a AMPK (Munday *et al.*, 1991).

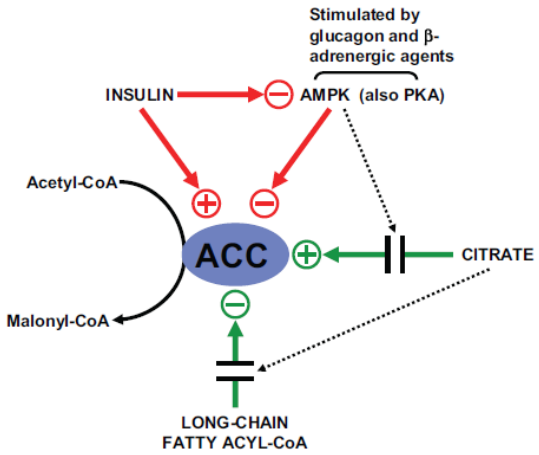


Figura 5. Regulação da acetil-CoA carboxilase (ACC) por efetores alostéricos e por fosforilação. Setas verdes correspondem a efetores alostéricos e setas vermelhas a fosforilação (retirado de Saggerson *et al.*, 2008).

Essa via atua em diversos órgãos, incluindo fígado, cérebro, músculo esquelético, coração, tecido adiposo e pâncreas (Santomauro Júnior *et al.*, 2008). A AMPK atua nas

mudanças no metabolismo lipídico, regulando a oxidação e a biossíntese de colesterol (HMG-CoA redutase) e ácidos graxos (Viollet *et al.*, 2009).

No músculo esquelético e no fígado, a ativação da AMPK ocorre na Thr 172 da subunidade α pela quinase upstream LKB1 (Steinberg *et al.*, 2009, Viollet *et al.*, 2009). Uma das consequências imediatas da ativação da AMPK é um aumento na captação de glicose pelo músculo esquelético através da translocação de GLUT4 para a membrana.

No músculo, a contração muscular ativa a AMPK como conseqüência da depleção de ATP e aumento de AMP e, provavelmente, também por meio da ativação de CAMKK em resposta às flutuações de Ca^{2+} citosólico durante a contração. AMPK também bloqueia a via da mTOR, principal componente da sinalização para síntese protéica e produção de biomassa (Koh *et al.*, 2008, Thomson *et al.*, 2009, Canto *et al.*, 2010). A AMPK inativa a ACC, principalmente a ACCβ, levando a diminuição de malonil-CoA que atua como inibidor alostérico da CPT-1, facilitando a entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria para sofrerem a beta-oxidação (Janovská *et al.*, 2008; Steinberg *et al.*, 2009, Fantino *et al.*, 2011).

A participação da via AMPK-ACC no metabolismo de lípides no músculo está esquematizada na figura abaixo.

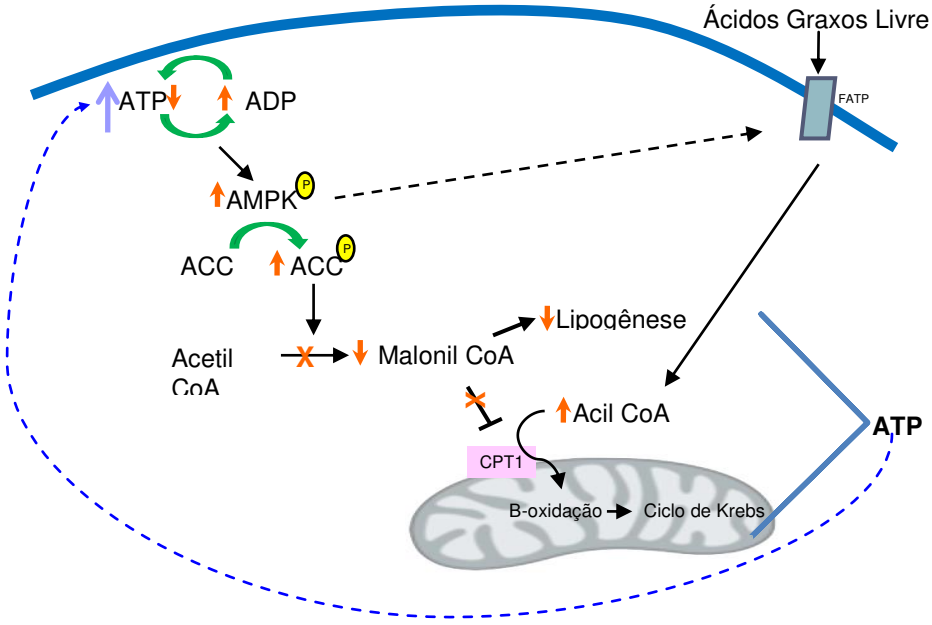


Figura 6. Regulação da oxidação lipídica no músculo esquelético pela AMPK. (Figura adaptada de Osler *et al.*, 2007).

JUSTIFICATIVA

O estudo das vias de sinalização envolvidas no metabolismo energético é de grande relevância fisiológica, uma vez que um desequilíbrio energético pode resultar em obesidade e/ou síndrome metabólica e aumento da mortalidade por doença cardiovascular. Estudos recentes de nosso grupo em três modelos experimentais que exibem dislipidemias genéticas revelaram alterações significativas da composição corporal, gasto energético e padrão de ingestão alimentar. Como está bem estabelecido que a AMPK é um importante regulador do metabolismo energético em diferentes órgãos, torna-se relevante estudar sua atividade nestas condições de alteração do balanço energético verificadas em modelos animais com modificações genéticas e fenotípicas do transporte de lípides plasmáticos, descritos a seguir:

- Animais hipoalfalipoproteinêmicos (redução de HDL-colesterol) pela super-expressão da proteína de transferência de colesteril éster (CETP)*:*

A CETP promove trocas de colesteril éster e triacilglicerol entre as lipoproteínas plasmáticas alterando sua concentração e composição química. Uma das consequências mais relevantes da ação da CETP é a redução dos níveis circulantes de HDL-colesterol (Tall *et al.*, 1995). Camundongos normalmente não expressam esta proteína. Camundongos transgênicos para CETP apresentam suscetibilidade alterada para aterosclerose que, dependendo do contexto metabólico, pode estar aumentada ou diminuída (Marotti *et al.*, 1993 e Hayek *et al.*, 1995). Observamos recentemente que os animais CETP apresentam significativa redução na massa adiposa visceral e subcutânea, no tamanho da célula adiposa e nos níveis circulantes de leptina. Estes efeitos foram mais evidentes em fêmeas. Estas têm discreto, porém, significativo, aumento da ingestão alimentar e manutenção de adiposidade reduzida em relação aos controles (Patrício PR, resultados não publicados, Tese de Doutorado). Nossa hipótese é de que a atividade da AMPK nos tecidos periféricos destes animais pode estar alterada, sinalizando aumento de catabolismo.

- Animais hipercolesterolêmicos por knockout do receptor de LDL (LDLR0):

A falta do receptor de LDL faz com esta lipoproteína acumule na circulação sanguínea aumentando a predisposição para desenvolvimento de aterosclerose. Além disso, os tecidos esteroidogênicos aumentam a síntese *de novo* de colesterol, o que leva o fígado a aumentar a secreção de VLDL agravando a hipercolesterolemia (Brown & Goldstein, 1986). Ishibashi et al (1993) empregaram a técnica da recombinação homóloga em células embrionárias para produzir camundongos com o gene do receptor de LDL inativado e assim reproduziram o fenótipo da hipercolesterolemia familiar. Camundongos machos e fêmeas que não expressam receptor de LDL (camundongos LDLR0) são viáveis e férteis. Sob dieta pobre em gordura e colesterol, a concentração de colesterol plasmático destes animais é 2 a 4 vezes maior que dos camundongos wild type, devido a um aumento de sete a nove vezes nas concentrações IDL e LDL, sem significativa alteração das HDL. Quando submetidos à dieta rica em gordura, esses animais desenvolvem aterosclerose e xantomatose severas (Ishibashi *et al*., 1994).

Observamos recentemente nestes animais redução da massa corporal, do ganho de peso e da eficiência alimentar. Estes animais também mostraram maior metabolismo corporal em repouso (consumo de O_2 e produção de CO_2) e redução significativa da atividade física espontânea (Dorighello GG, dados ainda não publicados, projeto de doutorado em andamento). Portanto, nossa hipótese é de que a atividade da AMPK e/ou de seu alvo, a ACC, no fígado e músculo destes animais pode estar alterada.

- Animais hipertrigliceridêmicos por super-expressão da apo CIII:

A super-expressão da apo CIII reduz a velocidade de remoção das VLDLs e seus remanescentes do compartimento plasmático por prejudicar o reconhecimento destas lipoproteínas ricas em triacilglicerol pelos seus receptores hepáticos além de inibir parcialmente a enzima lipoproteína lípase (LPL). Esta maior permanência na circulação sanguínea tem como conseqüência elevados níveis de triacilgliceróis e fornece mais ácidos graxos para os tecidos (Aalto-Setälä *et al*., 1992).

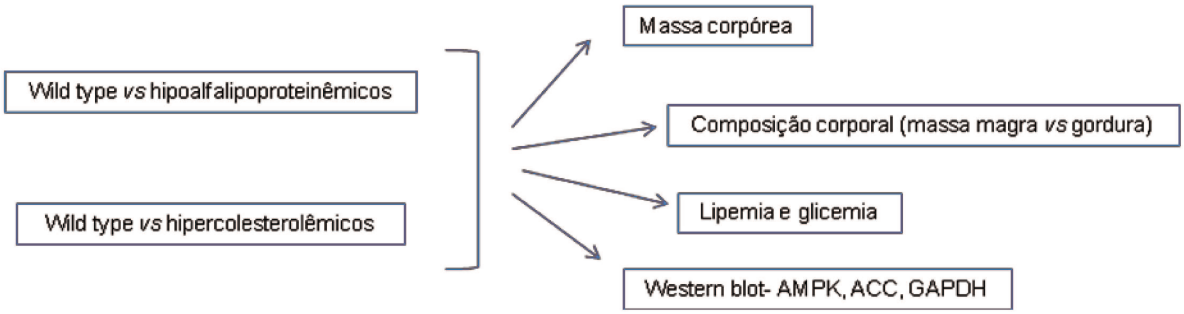
Observamos recentemente nestes animais aumento de metabolismo corporal (produção de CO_2 e temperatura retal), que pôde ser explicado bioquimicamente pelo aumento da atividade do canal mitocondrial de potássio sensível ao ATP (mitoKATP) que

desacopla as mitocôndrias aumentando a dissipação de energia. No entanto, os animais não são mais magros, uma vez que apresentam maior ingestão alimentar espontânea (Alberici *et al*., 2006). Assim, a hipótese é que ao avaliar se o regime de alimentação pareada à ingestão de animais controles (wild type) levará ao fechamento dos mitoKATP e emagrecimento dos animais.

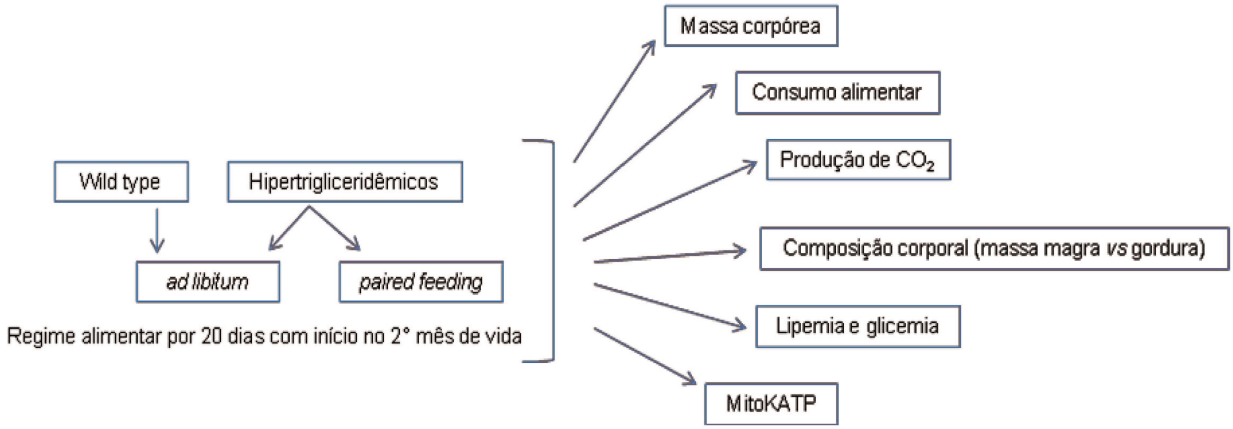
OBJETIVOS

Considerando que (1) está bem estabelecido que a AMPK é um importante regulador do metabolismo energético em diferentes órgãos, e (2) não existem estudos do estado de ativação da AMPK em dislipidemias genéticas, nos propusemos a estudar sua atividade, bem como de seu alvo, a ACC, em tecidos periféricos (fígado e músculo sóleo) de modelos animais com tais alterações, a saber hipoalfalipoproteinemia e hipercolesterolemia, os quais apresentam alterações do balanço energético. Um segundo objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da alimentação pareada (*paired feeding*) em camundongos geneticamente hipertrigliceridêmicos que apresentam além de maior ingestão alimentar, maior atividade do canal mitocondrial de potássio sensível ao ATP e maior metabolismo corporal. Os dois estudos estão esquematizados no fluxograma abaixo:

Objetivo 1: Estado de ativação da AMPK em tecidos de camundongos geneticamente dislipidêmicos.



Objetivo 2: Efeito da alimentação pareda sobre o metabolismo energético na hipertrigliceridemia



MATERIAIS E MÉTODOS

Animais geneticamente modificados

As colônias de animais geneticamente modificados utilizados neste estudo foram mantidas no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp (Certificado de Biossegurança 0069/98). Os camundongos transgênicos para o gene humano da CETP (linhagem 5203, Jiang *et al.*, 1992) e camundongos transgênicos para o gene humano da apoCIII (linhagem 3707, Walsh *et al.*, 1993) fundadores foram originalmente obtidos do Laboratório do Dr. Alan Tall da Divisão de Medicina Molecular da Columbia University, NY, E.U.A. e cruzados com animais wild type C57Bl6 obtidos do Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram tipados pelos seus respectivos fenótipos: atividade da CETP no plasma (>15% nos transgênicos e < 5% nos não-transgênicos) (Berti *et al.*, 2001) e concentração de triacilglicerol no plasma (transgênicos > 300 mg/dL e controles < 100 mg/dL). A colônia de animais *knockout* do receptor de LDL foi estabelecida a partir de matrizes do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA). Os *knockout* do receptor de LDL tem fenótipo de hipercolesterolemia (*wild type* < 100 e *knockout* = 200-300 mg/dL). O genótipo é determinado por reação em cadeia da DNA polimerase como previamente descrito (Ishibashi *et al.*, 1993).

Todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2°C), luminosidade (ciclo de claro-escuro de 12 horas) e receberam água e ração (Nuvilab®) ad libitum. O protocolo experimental deste estudo (nº 1601-1) foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CCEA-IB-UNICAMP) e está inserido no contexto do projeto CIBio 2008/02 da profa. Helena C. F. Oliveira, aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio/IB/Unicamp).

Os camundongos transgênicos para o gene humano da apoCIII foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais e divididos em dois grupos, sendo um em regime de *paired feeding* (HTG-PF) com os animais wild type C57Bl6 (WT-ad lib) e outro grupo *ab libitum* (HTG- ad lib). O regime de PF foi iniciado no segundo mês de idade e mantido por 20 dias, sendo a ração disponibilizada às 11 horas em dias alternados.

Os animais hipoalfalipoproteinêmicos e hipercolesterolêmicos e seus respectivos controles não transgênicos foram mantidos em dieta *chow* durante os 5 meses.

No final de cada protocolo experimental, os animais foram sacrificados alimentados e tiveram coletados o sangue total, o fígado, músculo esquelético (sóleo) e

os depósitos visíveis de tecido adiposo subcutâneo, peri-renal e perigonadal, para pesagem e demais análises subseqüentes.

Análises bioquímicas plasmáticas

Para obtenção do plasma, o sangue foi coletado com auxílio de capilares heparinizados, centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. Os lipídios plasmáticos foram determinados utilizando-se kits enzimáticos-colorimétricos: colesterol total e triacilglicerol por kits da Chod-Pap; Roche Diagnostic GmbH (Mannheim, Germany), e os e ácidos graxos livres por kit Wako Chemicals (Neuss, Germany), conforme instruções do fabricante. A glicemia foi medida com auxílio de glicosímetro Accu-Chek Advantage (Roche Diagnostic, Switzerland).

Atividade da CETP no plasma

Uma mistura de VLDL+LDL foi obtida por ultracentrifugação de plasma de doadores humanos normolipidêmicos e utilizada como lipoproteínas aceptoras. HDL também obtida por ultracentrifugação de plasma de doadores normolipidêmicos foi marcada radioativamente com ^{14}C-colesteril-éster (^{14}CCE) de acordo com Oliveira & Quintão (1996). O ensaio isotópico consistiu em uma reação contendo 50 µg de proteína de VLDL+LDL, 10000 dpm de ^{14}CCE-HDL e 5 µl do plasma fonte de CETP, em um volume final de reação de 100 µl. A mistura foi incubada a 40°C por 4 horas, permitindo a ação da CETP, que transferiu o colesteril-éster marcado da HDL para VLDL+LDL. Em seguida, foram adicionados à mistura 400 µl de tampão TSE (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH7,5, EDTA 1 mM pH 8,0) e 50 µl de coquetel de precipitação das lipoproteínas que contém apoB (partes iguais de sulfato de dextrana 1,6% e $MgCl_2$ 1,0 M). Esperou-se 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram então centrifugadas a 2800 rpm por 30 minutos a 10°C, garantindo que todas as lipoproteínas que contêm apoB, juntamente com o colesteril-éster marcado que foi transferido, precipitassem e apenas a HDL fosse recuperada no sobrenadante. Foram então misturados 450 µl do sobrenadante a 3 ml de solução cintiladora aquosa (ACS NACS104, GE Healthcare-Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) para determinação da radioatividade remanescente nas HDL em contador beta Beckman LS 6000AT (Fullerton, Califórnia, EUA). No ensaio foram utilizados sempre 2 *blanks* (tubos com tampão), 3 controles-negativos (tubos com plasma de camundongo

não-transgênico) e 2 controles-positivos (plasma de camundongos transgênicos). Todas as amostras foram feitas em duplicatas. Os resultados foram expressos como % de ^{14}CCE transferido da HDL para as VLDL+LDL: % CE transferido = 100 - (A / C * 100) onde, A = média em dpm das duplicatas das amostras e C = média em dpm das duplicatas dos controles-negativo.

Western Blot para AMPK e ACC total e fosforiladas

Os animais foram submetidos a deslocamento cervical e os tecidos foram rapidamente retirados e homogeneizados em solução tampão a 4°C (1% triton X-100, 100mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM pirofosfato de sódio, 100mM fluoreto de sódio, 10mM EDTA, 10mM orthovanadato de sódio, 2 mM PSMF e 0,1 mg/mL aprotinina) com o Polytron (Kinematica, Switzerland) por 30 segundos na velocidade máxima. Materiais insolúveis foram removidos através de centrifugação a 14.000 rpm a 4°C por 40 minutos, como descrito por Roman et al (2005). A concentração de proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (BioAgency). As dosagens foram realizadas pelo método descrito por Cesquini et al (2008) onde 50 µg de proteína de extrato de músculo esquelético (sóleo) e 30ug de proteína de fígado após rápida fervura (5 minutos) foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência durante aproximadamente 120 minutos a 120 V, em gelo, e banhadas com tampão de transferência. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 12 a 14 horas com anticorpos específicos [anti-AMPKα, anti-fosfo-AMPK (Thr172), anti-ACC, anti-fosfo-ACC (Ser79) (Cell Signaling) e GAPDH (FL-335- Santa Cruz)]. A fim de minimizar a ligação do anticorpo a proteínas não específicas foi realizada uma pré-incubação com tampão de bloqueio (5% de albumina, 10mM Tris, 150 mM NaCl, 0,02% Tween 20) por 1,5 hora. Após esse período as membranas foram incubadas por 2 horas com o anticorpo policlonal anti-IgG (Cell Signaling). Os resultados foram visualizados por autoradiografia com o filme Kodak XAR. A intensidade das bandas foram quantificadas pela densitometria óptica do filme de autoradiografia e analisadas pelo software UN-SCAN-IT Gel (versão 6.1) (Velloso *et al.*, 1996; Araújo *et al.*, 2005). Os valores da densitometria das bandas foram normalizados pelos valores da densitometria do controle interno GAPDH. Para análise da fosforilação protéica, os valores da densitometria das

proteínas fosforiladas foram normalizados pela expressão das proteínas totais (fosforilação protéica= proteína fosforilada/proteína total).

Taxa de produção de CO_2 *in vivo*

A produção de CO_2 *in vivo* foi medida em um respirômetro de temperatura controlada descrito por Calegario et al (2003). Os animais foram adaptados a câmara do respirômetro duas vezes por dia durante 5 minutos por 5 dias. Após a adaptação, a produção de CO_2 de cada camundongo foi monitorada por 5 minutos uma vez por dia, entre 9 e 11 horas, por 5 dias consecutivos. A taxa de produção de CO_2 de cada animal foi calculada como a média das 5 medições consecutivas.

Composição química da carcaça

As carcaças dos animais foram desidratadas durante 100 horas a 65°C até manter o peso constante. O total de água foi calculado através da subtração do peso seco pelo peso úmido. A gordura total da carcaça foi extraída com éter de petróleo (Labsynth, SP/Brasil) utilizando o aparato de soxhlet durante 96 horas e foi calculada pelo peso da carcaça antes menos o peso após a extração de lipídios. A massa corporal magra foi calculada como peso úmido menos peso total de lipídios.

Canal mitocondrial de potássio sensível ao ATP (mitoKATP)

A atividade do mitoKATP que desacopla as mitocôndrias foi determinado como descrito por Alberici *et al.* (2006) onde o inchamento da mitocôndria é estimado pela diminuição da absorbância de uma suspensão de mitocôndrias de fígado através de um espectrofotômetro (SLM Aminco DW 2000 spectrofotometer; SLM Instruments, Inc., Urbana, IL). A absorção de potássio na matriz mitocondrial através do mitoKATP é acompanhado por fosfato e água e resulta no inchamento mitocondrial. Isso ativa o antiporter K^+/H^+ gerando um ciclo de K^+ através da membrana interna mitocondrial. A ação concomitante do mitoKATP e do antiporter K^+/H^+ resulta na entrada de um próton para cada troca de K^+ e uma ligeira diminuição no potencial de membrana, que é acompanhado pelo aumento da freqüência respiratória mitocondrial (Alberici *et al.*, 2009).

Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). O número de animais usados em cada análise está indicado entre parênteses (n). Os dados experimentais foram analisados utilizando o Teste “t” de Student. No caso dos testes de normalidade (Kolmogorov e Smirnov) que acusaram heterogeneidade de variâncias, um teste não paramétrico foi usado. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo da ativação da AMPK e ACC em tecidos de camundongos geneticamente dislipidêmicos

Estudo nos animais hipoalfalipoproteinêmicos (CETP)

Fêmeas hipoalfalipoproteinêmicas (CETP, n=10) não apresentaram diferença na massa corporal total aos 5 meses de idade quando comparadas as wild type (WT, n=9) (Tab 2). No entanto, observou-se uma redução de aproximadamente 38% na massa relativa do tecido adiposo subcutâneo e 50% no tecido adiposo visceral, enquanto a massa magra e teor de água da carcaça estavam significativamente aumentados (Tab. 2). Os machos, por motivos desconhecidos, não apresentaram diferença significativa na massa relativa dos tecidos adiposos, e não foram estudados.

Tabela 2. Massa corporal e adiposa das fêmeas hipoalfalipoproteinêmicas (CETP) e wild type (WT).

	WT	CETP
Massa corporal total (g)	22,65 ± 0,53	22,10 ± 0,50
Adiposo visceral (% total)	1,78 ± 0,32	0,88 ± 0,08 $^{\#}$
Adiposo subcutâneo (% carcaça)	10,28 ± 1,34	6,44 ± 0,59 *
Massa magra (% carcaça)	28,16 ± 0,35	29,27 ± 0,24 §
Água (% carcaça)	61,56 ± 1,02	64,30 ± 0,39 $^{\&}$

Média ± epm. Fêmeas wild type (WT, n=9) e hipoalfalipoproteinêmicas (CETP, n=10). Símbolos representam diferença estatística entre os grupos (test T) $^{\#}$ p=0,015; *p=0,018, § p=0,016, $^{\&}$ p=0,022

Como esperado, os animais CETP apresentaram uma redução significativa de colesterol plasmático (-16%), à custa da redução de HDL (Jiang *et al.*, 1992). Os níveis plasmáticos de triacilglicerol, ácidos graxos livres e glicose das fêmeas CETP foram similares aos das fêmeas controles (Tab. 3).

Tabela 3. Concentrações plasmáticas de lipídeos e glicose em fêmeas hipoalfalipoproteinêmicas (CETP) e wild type (WT).

	WT	CETP
Glic (mg/dL)	107 ± 11	107 ± 7
Col (mg/dL)	89 ± 8	74 ± 7*
TG (mg/dL)	89 ± 5	90 ± 7
AGL (mEq/L)	2,12 ± 0,16	2,27 ± 0,20

Média ± epm. Glic (glicemia em jejum), Col (cholesterol total), TG (triacilglicerol), AGL (ácidos graxos livre). Fêmeas wild type (WT- n=6) e hipoalfalipoproteinêmicas (CETP- n=6), Diferença estatística entre os grupos (test T) *p<0,05.

Resultados sobre o estado de ativação da AMPK e da ACC no fígado dos animais CETP e controles (WT) são mostrados nas Fig. 7 e 8, respectivamente. A fração da AMPK ativada (razão entre a forma fosforilada e a massa total) no fígado não foi alterada (p=0,46, Fig. 7), assim como não houve modificação na razão de seu alvo, a ACC (p=0,63, Fig. 8). Estes resultados foram analisados com correção de dois padrões internos, a beta-actina (Santa Cruz) e o GAPDH. O fato da AMPK e da ACC não terem seus estados de fosforilação modificados indica que não há privação de energia, nem alteração do metabolismo de lípides nesse tecido. Resultados ainda não publicados de nosso grupo (Raposo HF, projeto de doutorado em andamento), onde a lipogênese foi determinada diretamente, indicam que, de fato, não ocorre alteração na lipogênese hepática dos animais CETP quando comparados aos *wild type*. Além disso, estes animais não apresentam esteatose hepática (acúmulo de gordura) nem variação na velocidade de secreção hepática de VLDL (Salerno *et al.*, 2009). Portanto, considerando-se o conjunto de dados, concluímos que a não alteração do estado de fosforilação da AMPK e ACC no tecido hepático dos animais CETP está de acordo com a manutenção das velocidades de síntese, armazenamento e "exportação" de lípides, previamente descritos nestes animais.

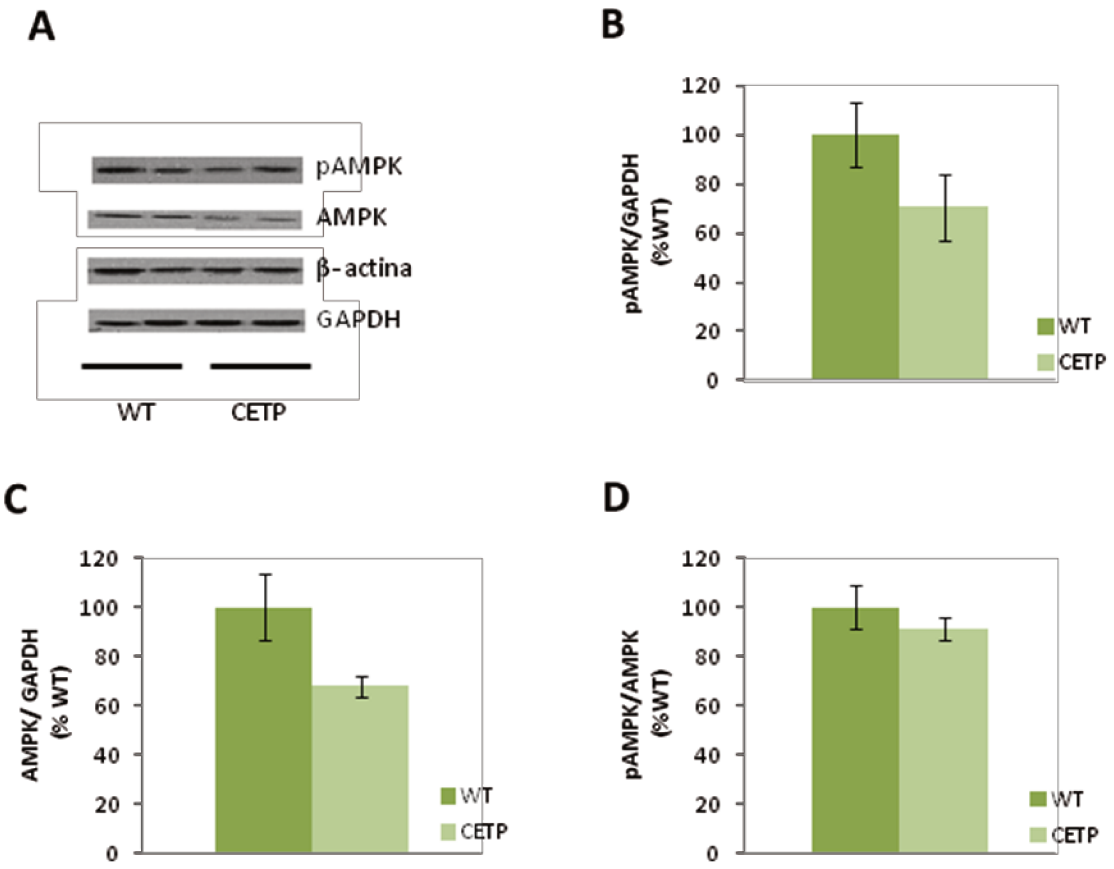


Figura 7. Estado de ativação da AMPK no fígado em fêmeas wild type (WT) e hipoalfalipoproteinêmicas (CETP). (A) Representação dos blots, (B) AMPK fosforilada (pAMPK/GAPDH, n= 5, p=0,13), (C) AMPK total (AMPK/GAPDH, n=5, p=0,10) e (D) ativação da AMPK (pAMPK/AMPK, n=5, p=0,46). Média ± epm.

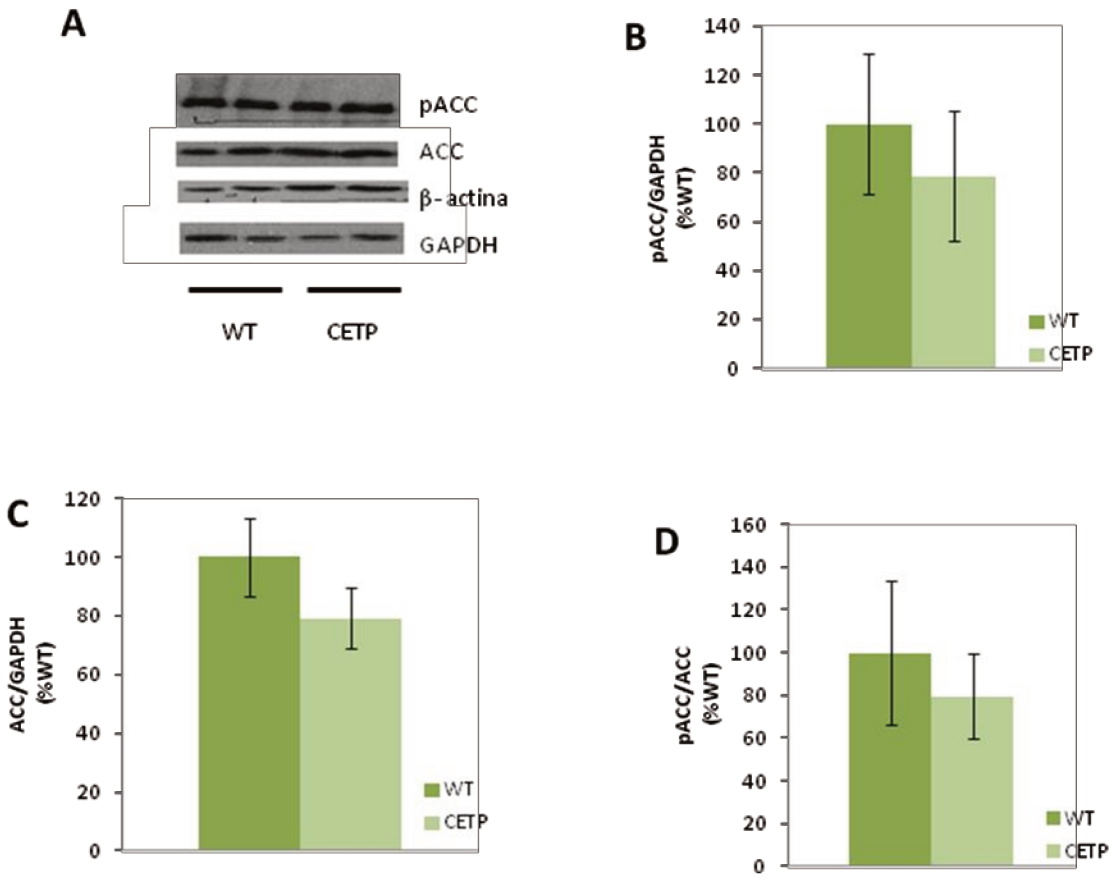


Figura 8. Estado de ativação da ACC no fígado em fêmeas wild type (WT) e hipoalfalipoproteinêmicas (CETP). (A) Representação dos blots, (B) ACC fosforilada (pACC/GAPDH,n=7, p=0,60), (C) ACC total (ACC/GAPDH, n=7, p=0,25) e (D) desativação da ACC (pACC/ACC, n=7, p=0,63). Média ± epm.

No músculo esquelético (sóleo) dos animais CETP não foi observado nenhuma alteração significativa na ativação da AMPK (p=0,48, Fig. 9), assim como não houve modificação na fosforilação de seu alvo, a ACC (p=0,96, Fig. 10). Pode-se então concluir que não há alteração de síntese e catabolismo lipídico no músculo dos animais CETP.

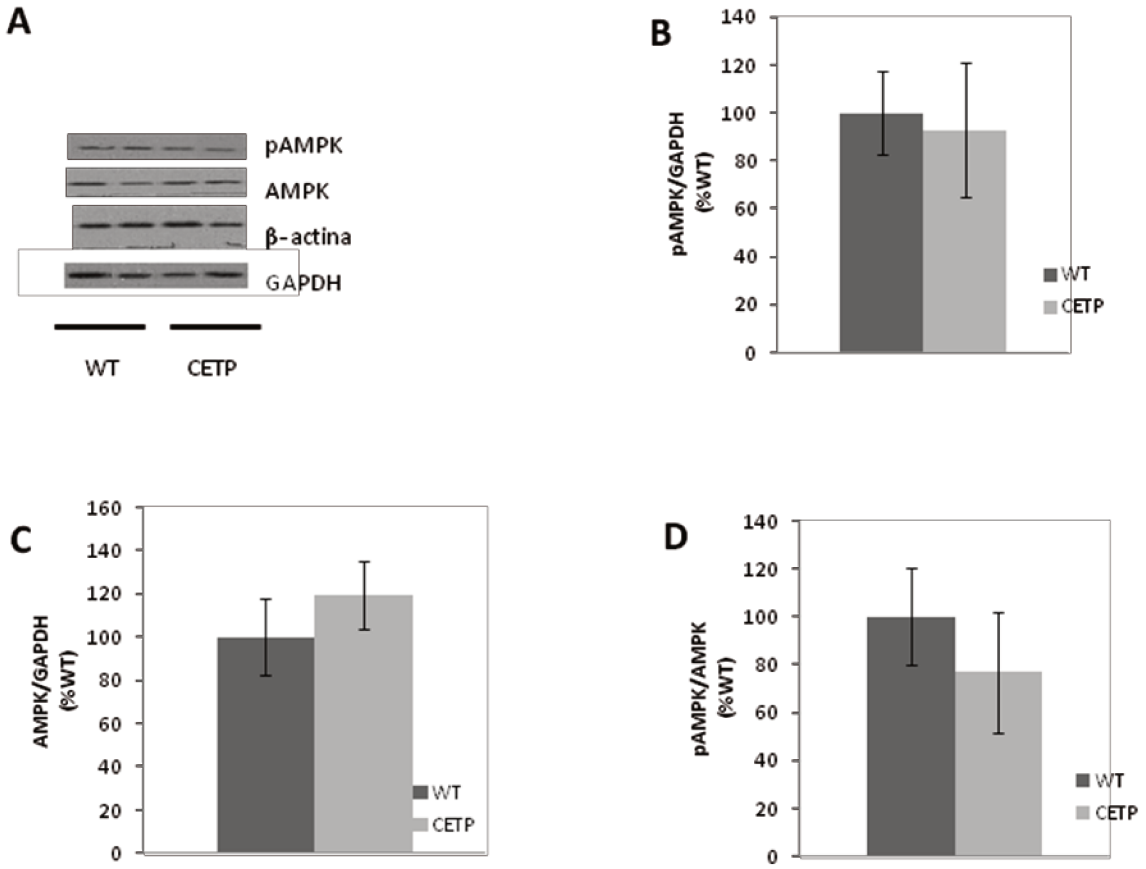


Figura 9. Estado de ativação da AMPK no tecido muscular (sóleo) em fêmeas wild type (WT) e hipoalfalipoproteinêmicas (CETP). (A) Representação dos blots, (B) AMPK fosforilada (pAMPK/GAPDH, n= 7, p=0,83), (C) AMPK total (AMPK/GAPDH, n=7, p=0,42) e (D) ativação da AMPK (pAMPK/AMPK, n=7, p=0,48). Média ± epm.

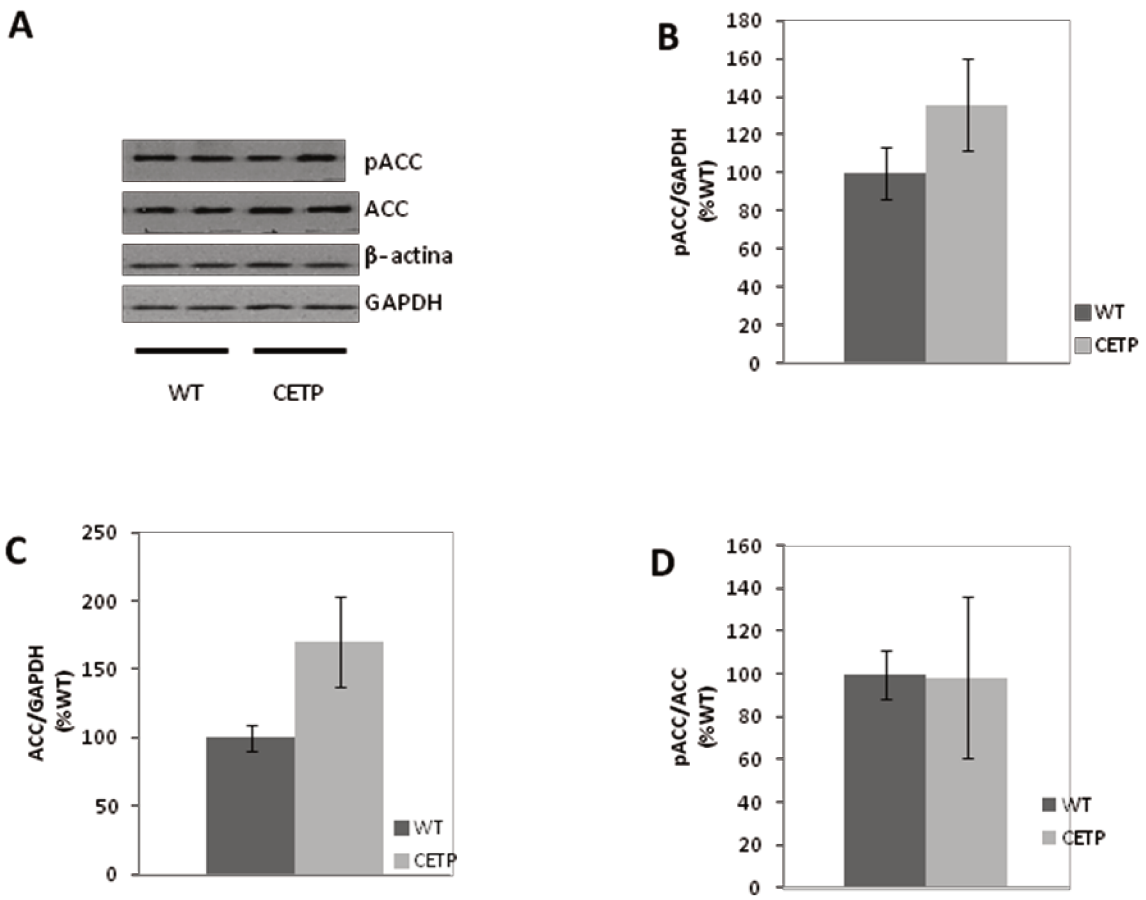


Figura 10. Estado de ativação da ACC no músculo em fêmeas wild type (WT) e hipoalfalipoproteinêmicas (CETP). (A) Representação dos blots, (B) ACC fosforilada (pACC/GAPDH,n=6, p=0,21), (C) ACC total (ACC/GAPDH, n=6, p=0,06) e (D) desativação da ACC (pACC/ACC, n=6, p=0,96). Média ± epm.

De modo geral, podemos dizer que a sinalização da AMPK não está ativada nestes dois tecidos (fígado e músculo) e, portanto, que o maior metabolismo corporal observado nestes animais deve estar sendo causado por alterações em outros tecidos do corpo, por exemplo, o próprio tecido adiposo. Resultados anteriores (Patrício PR, tese de doutorado) mostraram aumento da expressão do mRNA da AMPK no tecido adiposo dos animais CETP. Corroborando estes achados, resultados do grupo ainda não publicados (Raposo HF, tese de doutorado em andamento) mostram um aumento da lipólise no tecido adiposo das fêmeas CETP quando comparadas as controles (*wild type*). Assim, este resultado aponta que o tecido adiposo, e provavelmente outros tecidos (exemplo, tecido adiposo marrom) podem ser responsáveis pelo maior gasto energético global neste grupo. Esses achados estão resumidos na figura abaixo.

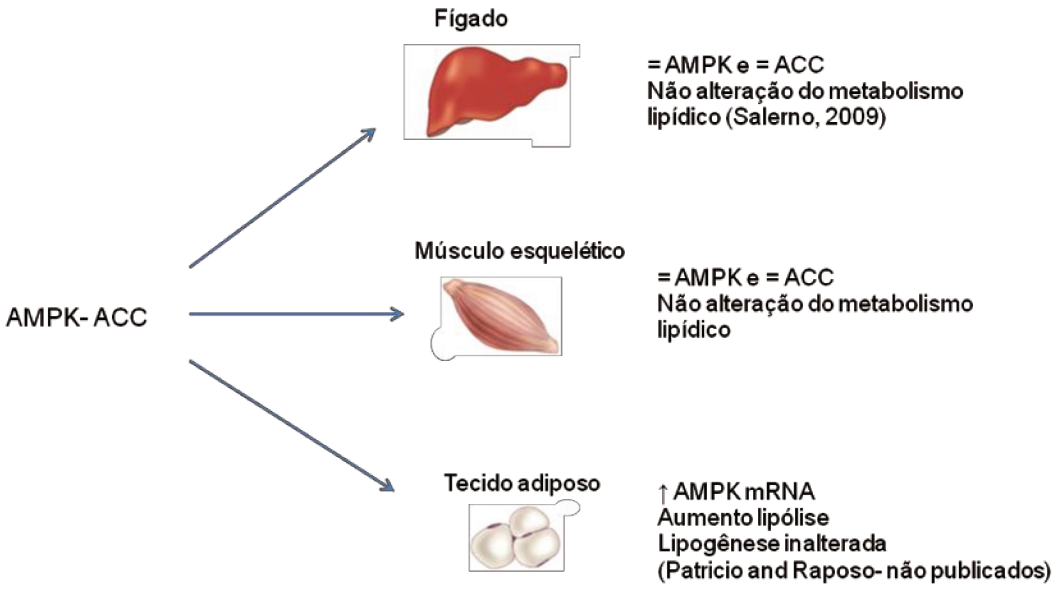


Figura 11. Participação da via da AMPK-ACC no metabolismo lipídico do fígado, músculo e adiposo de camundongos hipoalfalipoproteinêmicos por super-expressão da CETP.

Estudo nos animais hipercolesterolêmicos (LDLR0)

Fêmeas hipercolesterolêmicas (R0-F, n=8) apresentaram uma redução de 10% na massa corporal total aos 5 meses de idade quando comparadas aos animais *wild type* (WT-F, n=8) (Tab. 4). Não foi observada diferença na massa relativa do tecido adiposo visceral (tecido adiposo perigonadal somado ao tecido adiposo peri-renal) visível, no entanto, há uma redução significativa na massa relativa do tecido muscular (sóleo) sugerindo que estes animais apresentam uma diminuição da massa magra (Tab. 4). Nos machos hipercolesterolêmicos (R0-M, n=7) a redução na massa corporal total foi ainda maior (22%, $p<0,05$, Tab. 5) e, assim como nas fêmeas, não foi notada nenhuma alteração na massa relativa do tecido adiposo visceral visível, porém a diminuição encontrada na massa relativa do tecido muscular não foi significativa.

Tabela 4. Massa corporal e adiposa das fêmeas hipercolesterolêmicas (R0) e wild type (WT).

	WT-F	R0-F
Massa corporal total (g)	20,71 ± 0,54	18,67 ± 0,24$^{\#}$
Adiposo visceral (% total)	0,92 ± 0,10	1,05 ± 0,13
Músculo soleo (% total)	0,068 ± 0,002	0,054 ± 0,002$^{\&}$

Média ± epm. Fêmeas *wild type* (WT-F, n=8) e hipercolesterolêmcias (R0-F, n=8). Tecido adiposo visceral representa a soma do tecido adiposo perigonadal e peri-renal. Símbolos representam diferença estatística entre os grupos (test T) $^{\#}$ p=0,004; $^{\&}$p<0,05.

Tabela 5. Massa corporal e adiposa dos machos hipercolesterolêmicos (R0) e wild type (WT).

	WT-M	R0-M
Massa corporal total (g)	30,74 ± 1,02	23,84 ± 0,27$^{\#}$
Adiposo visceral (% total)	1,29 ± 0,07	1,51 ± 0,16
Músculo soleo (% total)	0,061 ± 0,004	0,057 ± 0,003

Média ± epm. Machos *wild type* (WT-M, n=7) e hipercolesterolêmicos (R0-M, n=7). Tecido adiposo visceral representa a soma do tecido adiposo perigonadal e peri-renal. Diferença estatística entre os grupos (test T) $^{\#}$ p<0,05.

Os níveis plasmáticos de colesterol, triacilglicerol e glicose dos animais estudados são apresentados nas Tabelas 6 (fêmeas) e 7 (machos). Como esperado, os animais

hipercolesterolêmicos mostram aumento nos níveis de triacilglicerol e colesterol quando comparados aos animais *wild type*.

Tabela 6**.** Concentrações plasmáticas de lipídeos e glicose em fêmeas hipercolesterolêmicas (R0) e wild type (WT).

	WT-F	R0-F
Glic (mg/dL)	110 ± 5	124 ± 6
TG (mg/dL)	56 ± 5	127 ± 11[#]
Col (mg/dL)	83 ± 2	197 ± 4[&]

Média ± epm. Glic (glicemia em estado alimentado), Col (colesterol total), TG (triacilglicerol). Fêmeas *wild type* (WT-F, n=8) e hipercolesterolêmicas (R0-F, n=8). Diferença estatística entre os grupos (test T) [#, &] p<0,001.

Tabela 7. Concentrações plasmáticas de lipídeos e glicose em machos hipercolesterolêmicos (R0) e wild type (WT).

	WT-M	R0-M
Glic (mg/dL)	125 ± 6	142 ± 7
TG (mg/dL)	60 ± 4	138 ± 17[#]
Col (mg/dL)	94 ± 3	315 ± 16[&]

Média ± epm. Glic (glicemia em estado alimentado), Col (colesterol total), TG (triacilglicerol). Machos *wild type* (WT-M, n=7) e hipercolesterolêmicos (R0-M, n=7). Diferença estatística entre os grupos (test T) [#, &] p<0,001.

Resultados sobre a ativação da AMPK e da ACC no fígado das fêmeas hipercolesterolêmicas são mostrados nas Fig. 12 e 13, respectivamente. A razão AMPK fosforilada pela massa total da quinase, isto é, o indicador de ativação da AMPK no fígado destas fêmeas apresentou-se aumentada (53%, p=0,02, Fig. 12D). No entanto, não houve alteração na fosforilação de seu alvo, a ACC (p=0,60, Fig. 13D). Nos machos, assim como nas fêmeas, foi observado um aumento marginal na ativação da AMPK (p=0,08, Fig. 14D) sem alteração da fosforilação da ACC (p=0,92, Fig. 15D). Isso significa que não houve inibição da lipogênese ou ativação da beta-oxidação no fígado dos animais hipercolesterolêmicos. Este resultado está de acordo com estudos prévios que demonstraram aumento de lipogênese (Oliveira *et al.*, 2005) e redução dos intermediários do ciclo de Krebs (Paim *et al.,* 2008) nestes animais. Portanto, esse aumento de lipogênese pressupõe preservação da atividade da ACC e não seria compatível com

fosforilação (inibição) desta enzima. Embora a via que leva a alterações do metabolismo lipídico celular (AMPK-ACC) não esteja modificada nestes animais, é possível que outros alvos da AMPK estejam sendo fosforilados e que o metabolismo de outros nutrientes (proteínas e carboidratos) possa estar alterado.

Para explicar o resultado de ativação da AMPK sem correspondente fosforilação de seu alvo ACC, poderíamos especular sobre o aumento da atividade de uma fosfatase que desfosforila a ACC. Sabe-se que existem 3 classes de fosfatases da ACC. As fosfatases da classe I removem o fosfato sem alterar a atividade da ACC, as da classe II, mas não as da classe III, são dependentes de citrato (Kim *et al.*, 1989). No caso dos animais LDLR0, como existe deficiência de substratos do ciclo de Krebs (Paim *et al.*, 2008), somente seria possível o envolvimento das fosfatases da classe I ou III.

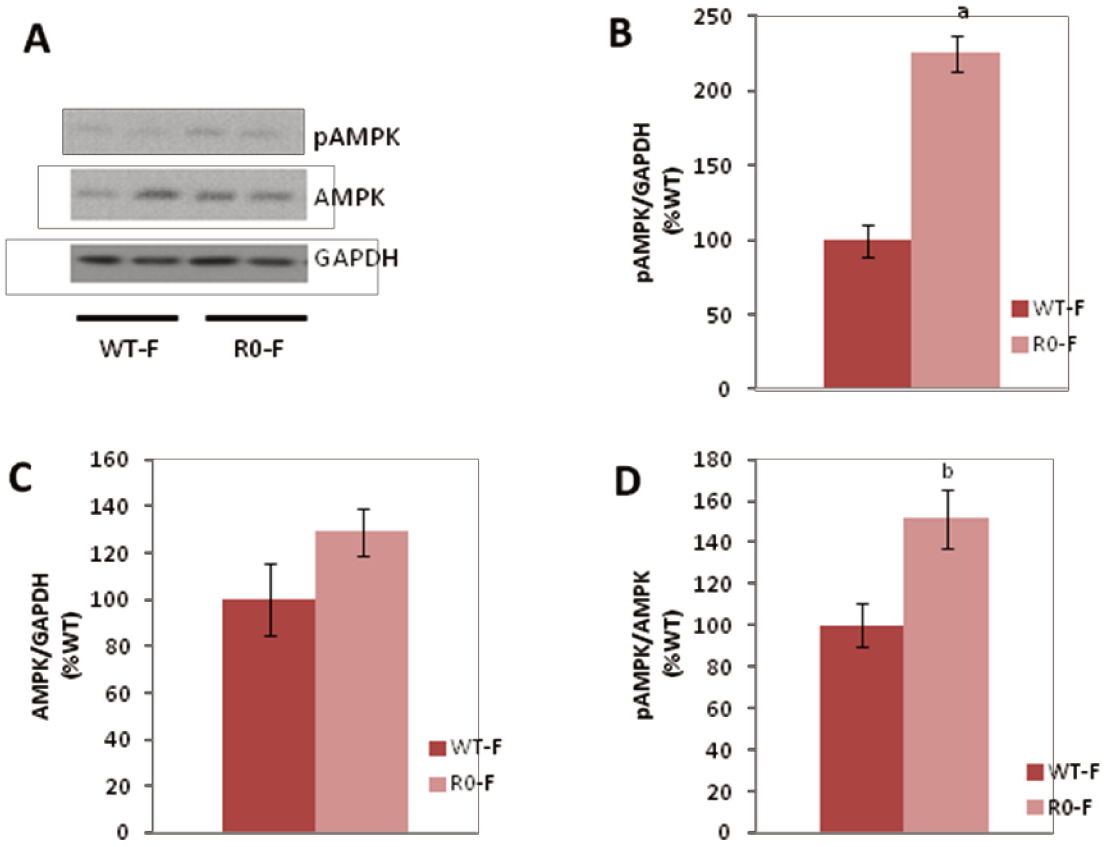


Figura 12. Estado de ativação da AMPK no fígado em fêmeas wild type (WT-F) e hipercolesterolêmicas (R0-F). (A) Representação dos blots, (B) AMPK fosforilada (pAMPK/GAPDH, n=6, p<0,001), (C) AMPK total (AMPK/GAPDH, n=6, p=0,14) e (D) ativação da AMPK (pAMPK/AMPK, n=6, p=0,017). Média ± epm. Letras indicam diferença estatística entre os grupos (test T) [a]p<0,001, [b]p=0,017.

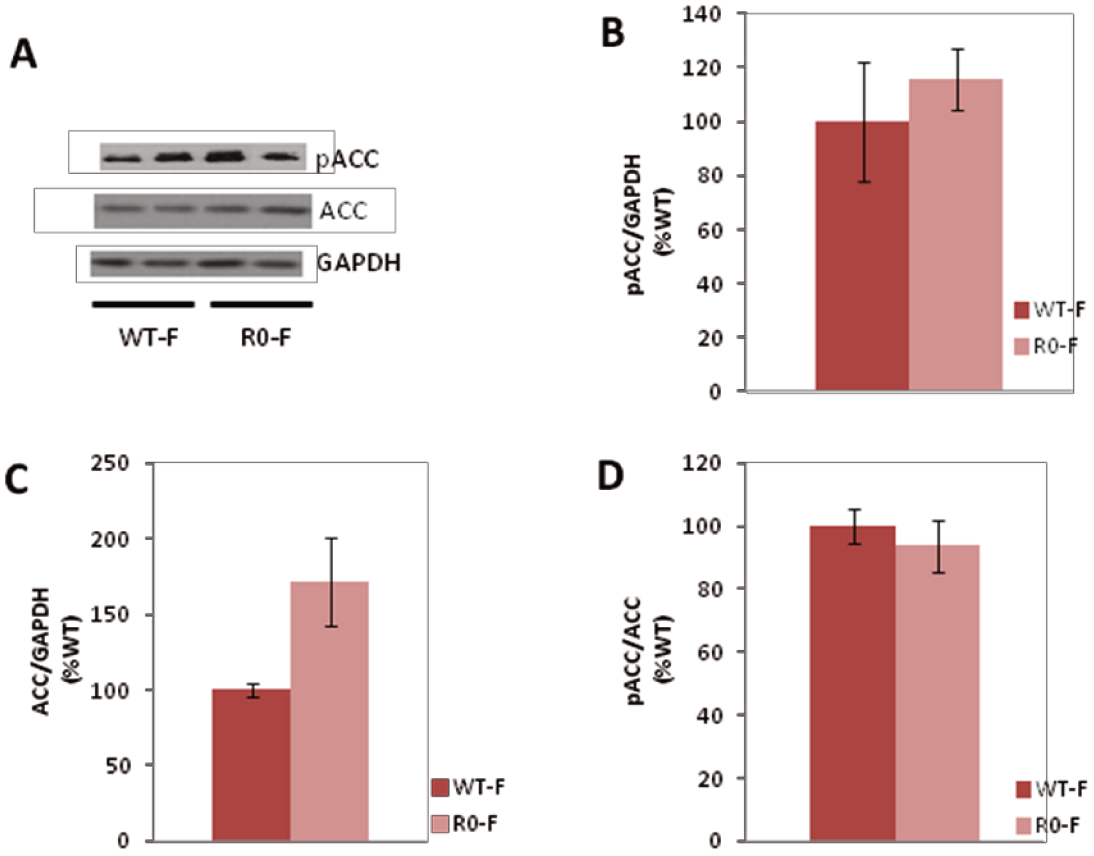


Figura 13. Estado de ativação da ACC no fígado em fêmeas wild type (WT-F) e hipercolesterolêmicas (R0-F). (A) Representação dos blots, (B) ACC fosforilada (pACC/GAPDH,n=6, p=0,56), (C) ACC total (ACC/GAPDH, n=6, p=0,07) e (D) desativação da ACC (pACC/ACC, n=6, p=0,60). Média ± epm.

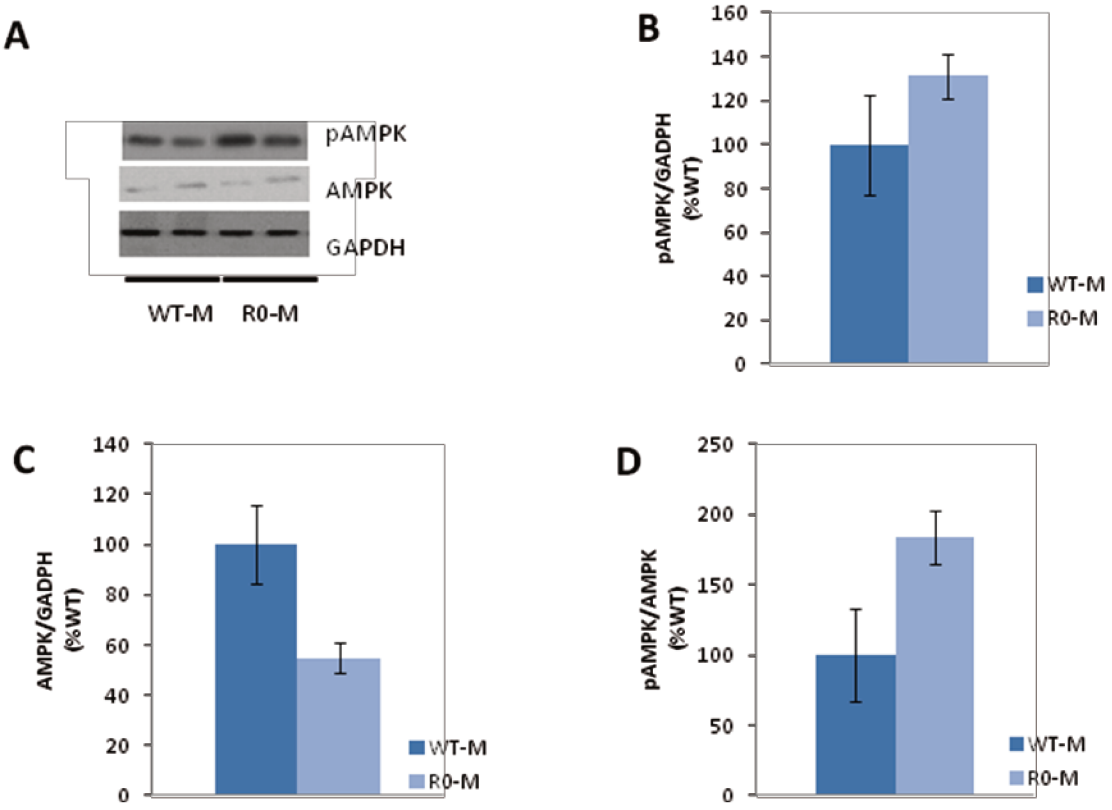


Figura 14. Estado de ativação da AMPK no fígado em machos wild type (WT-M) e hipercolesterolêmicos (R0-M). (A) Representação dos blots, (B) AMPK fosforilada (pAMPK/GAPDH, n=6, p=0,77), (C) AMPK total (AMPK/GAPDH, n=6, p=0,10) e (D) ativação da AMPK (pAMPK/AMPK, n=6, p=0,08). Média ± epm.

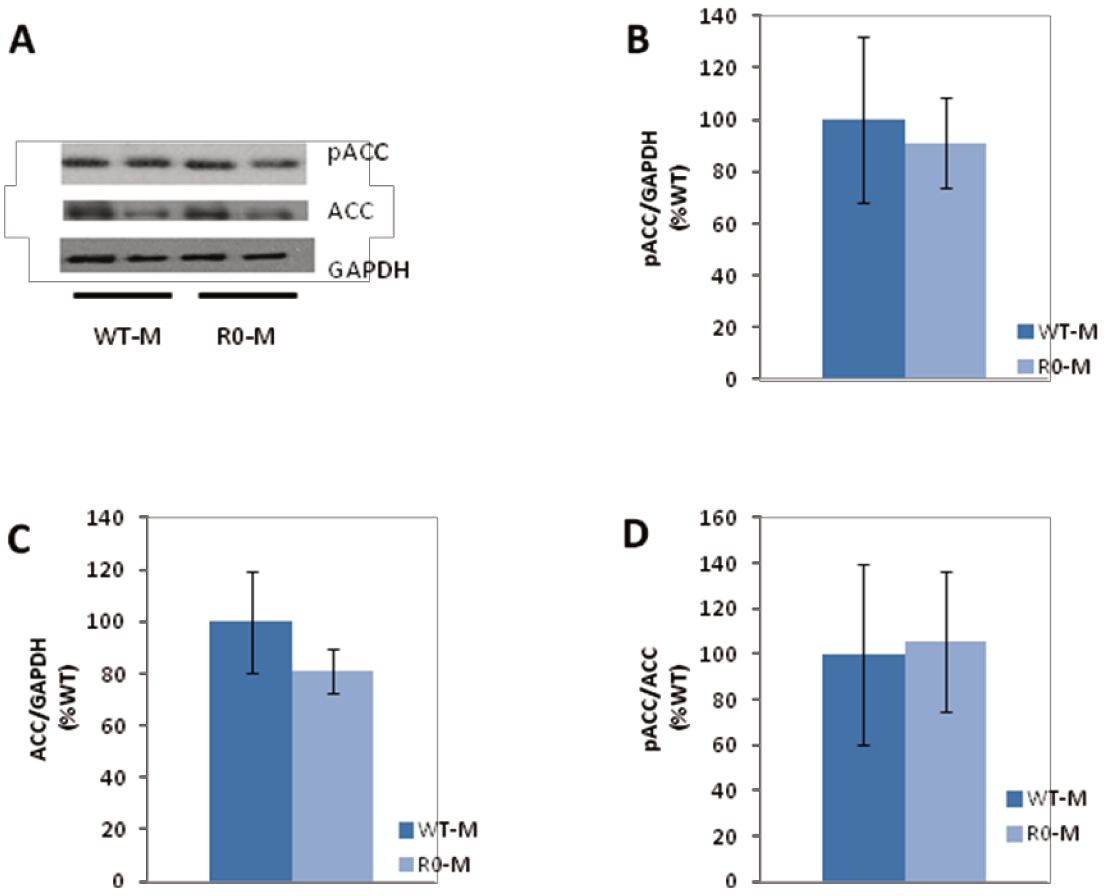


Figura 15. Estado de ativação da ACC no fígado em machos wild type (WT-M) e hipercolesterolêmicos (R0-M). (A) Representação dos blots, (B) ACC fosforilada (pACC/GAPDH,n=6, p=0,83), (C) ACC total (ACC/GAPDH, n=6, p=0,46) e (D) desativação da ACC (pACC/ACC, n=6, p=0,92). Média ± epm.

No músculo sóleo de fêmeas e machos LDLR0 não observamos alterações de fosforilação da AMPK (Fig. 16, 18) e da ACC (Fig. 17, 19), demonstrando que não houve alteração na homeostase energética neste tecido dos animais hipercolesterolêmicos.

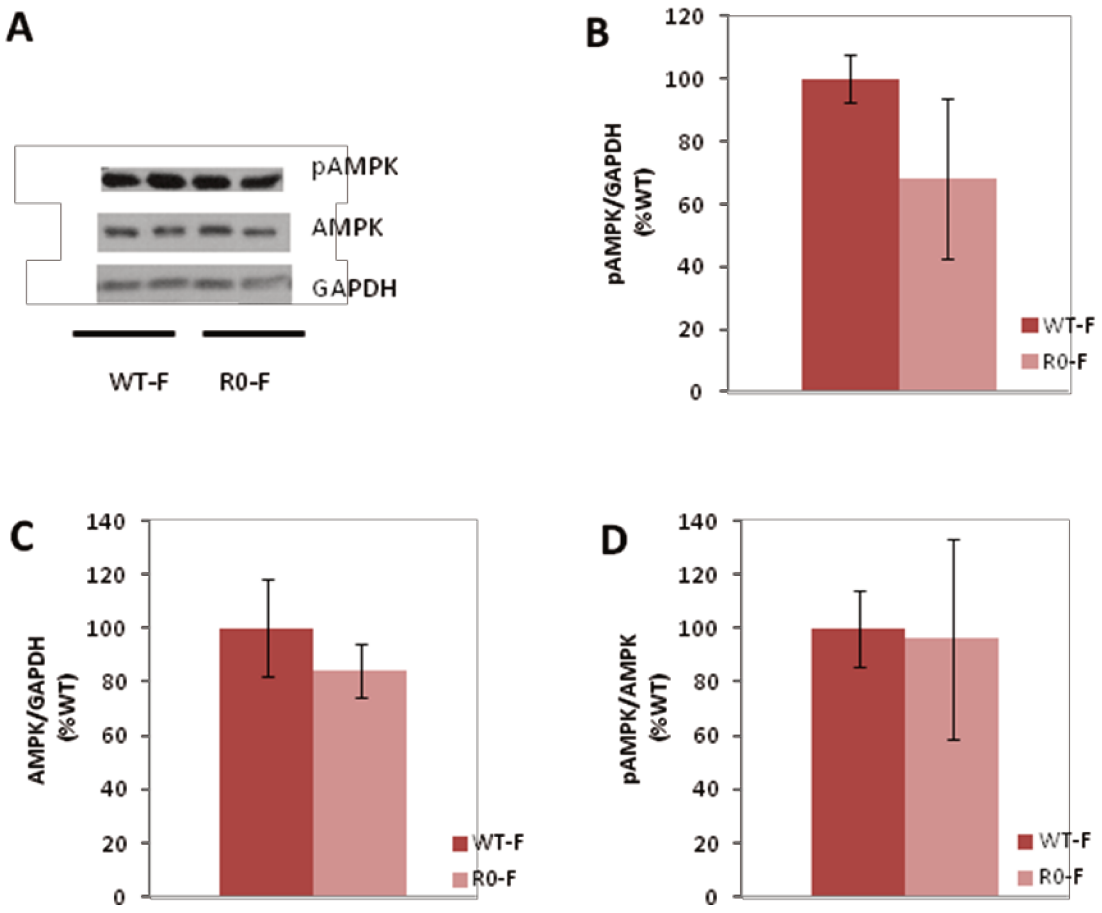


Figura 16. Estado de ativação da AMPK no tecido muscular (sóleo) em fêmeas wild type (WT-F) e hipercolesterolêmicas (R0-F). (A) Representação dos blots, (B) AMPK fosforilada (pAMPK/GAPDH, n=5, p=0,26), (C) AMPK total (AMPK/GAPDH, n=5, p=0,49) e (D) ativação da AMPK (pAMPK/AMPK, n=6, p=0,92). Média ± epm.

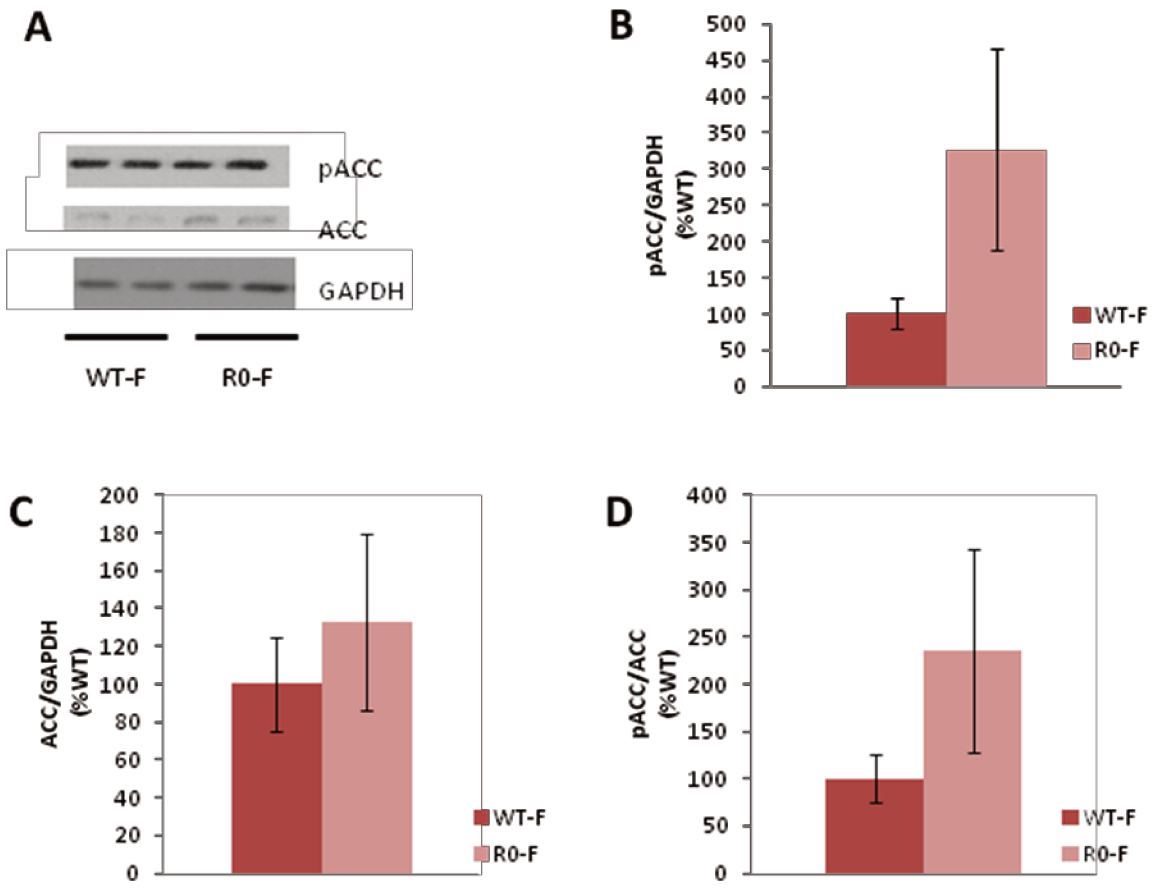


Figura 17. Estado de ativação da ACC no tecido muscular (sóleo) em fêmeas wild type (WT-F) e hipercolesterolêmicas (R0-F). (A) Representação dos blots, (B) ACC fosforilada (pACC/GAPDH,n=6, p=0,10), (C) ACC total (ACC/GAPDH, n=6, p=0,56) e (D) desativação da ACC (pACC/ACC, n=6, p=0,22). Média ± epm.

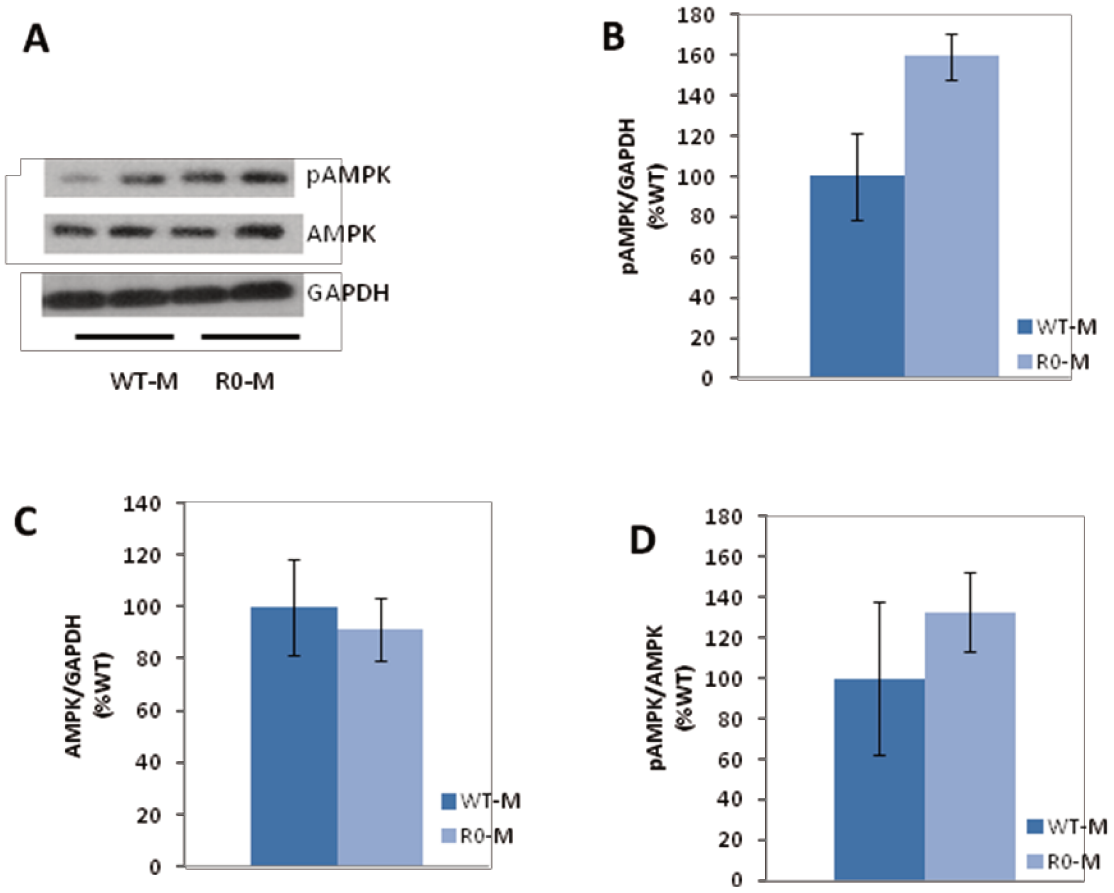


Figura 18. Estado de ativação da AMPK no tecido muscular (sóleo) em machos wild type (WT-M) e hipercolesterolêmicos (R0-M). (A) Representação dos blots, (B) AMPK fosforilada (pAMPK/GAPDH, n=6, p=0,07), (C) AMPK total (AMPK/GAPDH, n=6, p=0,68) e (D) ativação da AMPK (pAMPK/AMPK, n=6, p=0,25). Média ± epm.

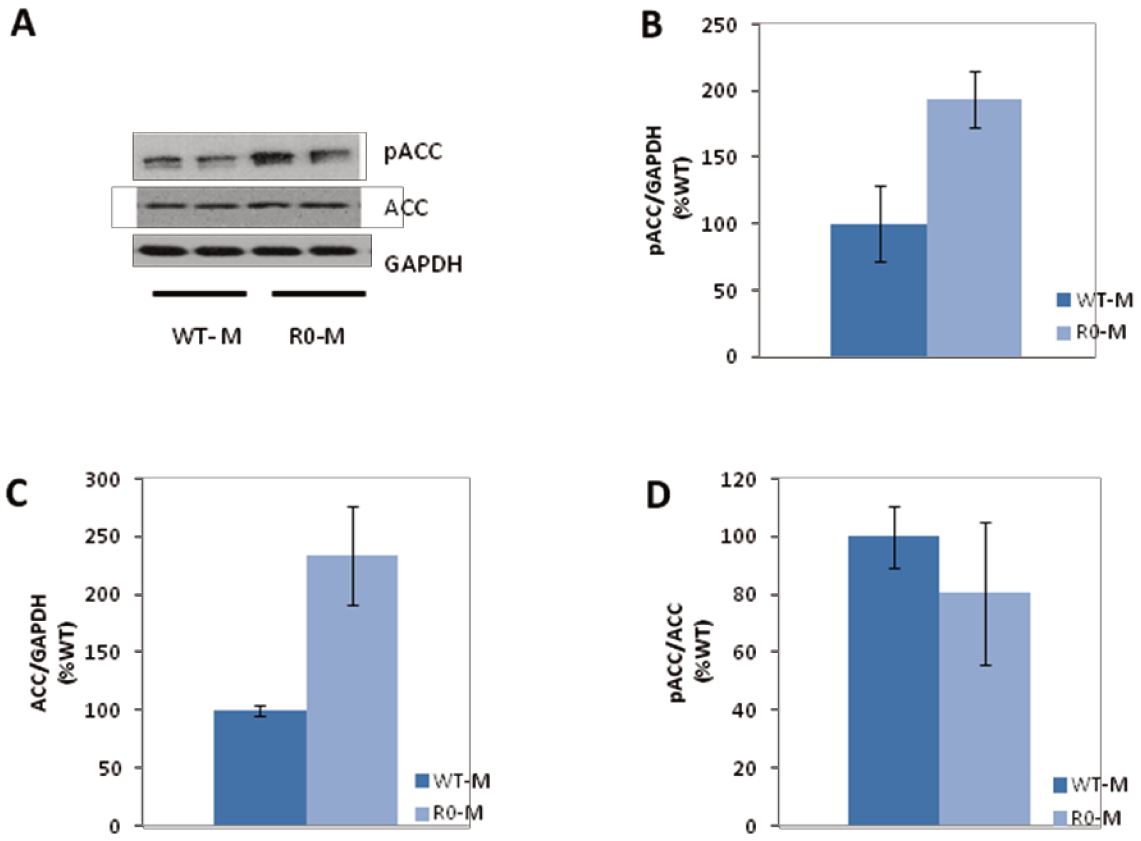


Figura 19. Estado de ativação da ACC no tecido muscular (sóleo) em machos wild type (WT-M) e hipercolesterolêmicos (R0-M). (A) Representação dos blots, (B) ACC fosforilada (pACC/GAPDH,n=6, p=0,26), (C) ACC total (ACC/GAPDH, n=6, p=0,07) e (D) desativação da ACC (pACC/ACC, n=6, p=0,55). Média ± epm.

Nos animais deficientes de receptor de LDL, especialmente em tecidos esteroidogênicos como o fígado, a falta de captação de colesterol exógeno reduz o teor de colesterol das membranas do retículo endoplasmático resultando em ativação do fator de transcrição SREBP2 (*sterol regulatory element binding protein2)*, o qual, por sua vez, ativa a transcrição da HMG-CoA redutase, enzima que regula a biossíntese de colesterol (Brown & Goldstein, 2009). Assim, o fígado tem um aumento acentuado da esteroidogênese para suas necessidades intracelulares, para produção de ácido biliar e para secreção de VLDL. O fígado sintetiza também os outros componentes da VLDL, tais como TG, para exportar colesterol para circulação sanguínea (Gibbson *et al., 2004*). O

acentuado aumento de síntese *de novo* de colesterol e TG (Oliveira *et al.*, 2005) consome quantidades consideráveis de intermediários do ciclo de Krebs (Paim *et al.*, 2008). Isso possivelmente sinaliza um estado de privação energética que desencadeia a ativação da AMPK. No entanto, uma das vias *downstream* da AMPK, a inibição da lipogênese, não ocorre nestas células com defeito do receptor de LDL, porém é provável que ocorra inibição da síntese e aceleração de catabolismo dos outros macronutrientes. Em síntese, nos animais hipercolesterolêmicos, a AMPK está ativada no fígado, mas não no músculo, sem correspondente fosforilação (inibição) da ACC. Isso sugere que deve haver um aumento de catabolismo de nutrientes não-lipídicos no fígado destes animais, para fornecimento de substratos para a síntese aumentada de colesterol e lipídeos neste órgão (Oliveira *et al.*, 2005), como mostrado na figura abaixo.

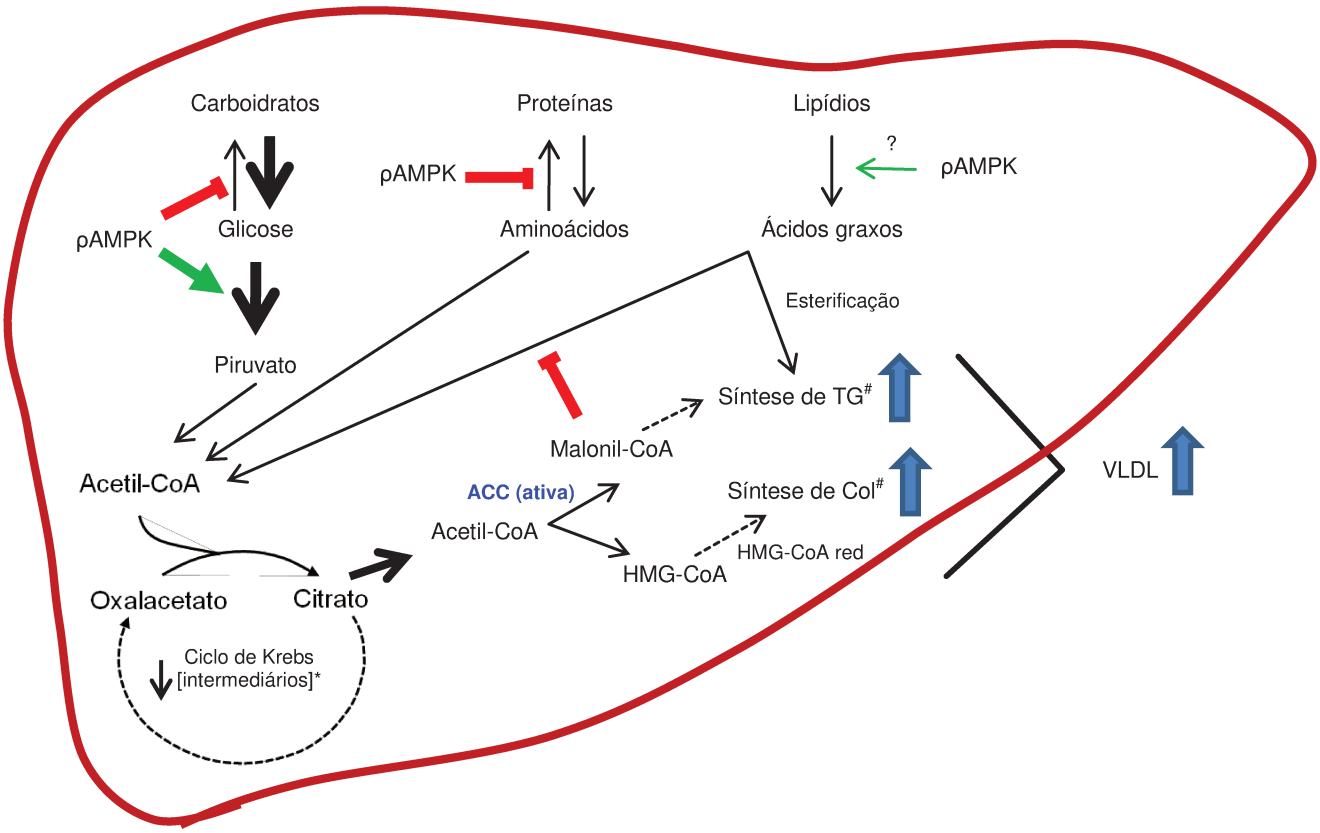


Figura 20. Modelo proposto para explicar ativação da AMPK em fígado de camundongos hipercolesterolêmicos. * Paim et al, 2008; # Oliveira et al, 2005.

Efeito da alimentação pareada em camundongos hipertrigliceridêmicos

Em estudos anteriores, verificou-se que os animais HTG (apo CIII transgênicos) ingerem maior quantidade de ração e mantêm a mesma massa corporal quando comparados aos controles (Alberici *et al.*, 2006). Isso nos levou a estudar nestes animais o efeito da alimentação pareada (*paired feeding,* PF) aos controles wild type (WT). Após 20 dias de alimentação pareada, com início no segundo mês de vida, as fêmeas e os machos HTG-PF apresentaram uma redução de aproximadamente 17% na ingestão cumulativa de ração, ao longo do período deste regime alimentar (Fig. 21).

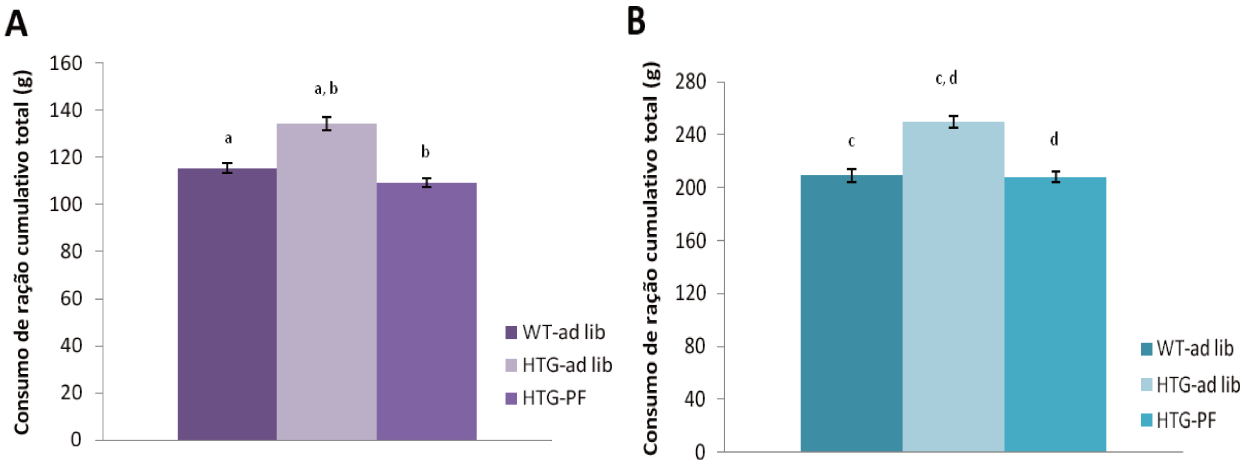


Figura 21. Ingestão alimentar cumulativa durante 20 dias dos animais hipertrigliceridêmicos (HTG) e wild type (WT). (A) Fêmeas wild type *ad libitum* (WT-ad lib, n=5), hipertrigliceridêmicas *ad libitum* (HTG-ad lib, n=3) e hipertrigliceridêmicas em *paired feeding* (HTG-PF, n=5). (B) Machos wild type ad libidum (WT-ad lib, n=7), hipertrigliceridêmicos ad libidum (HTG-ad lib, n=7) e hipertrigliceridmicos em *paired feeding* (HTG-PF, n=7). Letras iguais representam diferença estatística (test T) [a] p=0,04, [b] p=0,01, [c] p=0,01, [d] p=0,04.

Comparando-se a lipemia tanto das fêmeas quanto dos machos HTG ad-lib e PF (Tab. 8 e Tab. 9), verificamos que este regime alimentar causou uma expressiva redução de aproximadamente 40% na concentração plasmática de TG entre o início e fim do tratamento. O regime alimentar PF não alterou os níveis de colesterol dos animais HTG.

Tabela 8. Concentrações plasmáticas de lipídeos em fêmeas controles wild type (WT-ad lib), hipertrigliceridêmicas ad libitum (HTG- ad lib) e em regime de alimentação pareada (HTG-PF).

	WT- ad lib	HTG-ad lib	HTG-PF
Glic (mg/dL)	107 ± 9	104 ± 8	82 ± 2
Col (mg/dL)	50 ± 5 [a,b]	87 ± 4 [a,b]	78 ± 4 [a]
TG inicial (mg/dL)	133 ± 10 [c,d]	476 ± 21 [d]	464 ± 16 [c,g]
TG final (mg/dL)	116 ± 8 [e,f]	438 ± 53 [e]	275 ± 46 [f,g]

Média ± epm. Glic (glicemia em jejum), Col (colesterol total), TG (triacilglicerol). Fêmeas wild type *ad libitum* (WT-ad lib, n=5), hipertrigliceridêmicas *ad libitum* (HTG-ad lib, n=3) e hipertrigliceridêmicas em regime de *paired feeding* (HTG-PF, n=5). Letras iguais representam diferença estatística (test T) [a] p=0,029, [b] p=0,013, [c] p<0,0001, [d] p=0,0001, [e] p=0,027, [f] p=0,004, [g]p=0,018.

Tabela 9. Concentrações plasmáticas de lipídeos em machos controles wild type (WT-ad lib), hipertrigliceridêmicos ad libitum (HTG- ad lib) e em regime de alimentação pareada (HTG-PF).

	WT- ad lib	HTG-ad lib	HTG-PF
Col (mg/dL)	95 ± 7 [a,b]	169 ± 15 [b]	190 ± 24 [a]
TG inicial (mg/dL)	70 ± 12 [c,d]	438 ± 90 [d]	516 ± 68 [c,g]
TG final (mg/dL)	94 ± 8 [e,f]	540 ± 86 [e]	317 ± 93 [f,g]

Média ± epm. Col (colesterol total), TG (triacilglicerol). Machos wild type *ad libitum* (WT-ad lib, n=6), hipertrigliceridêmico *ad libitum* (HTG-ad lib, n=6) e hipertrigliceridêmico em regime de *paired feeding* (HTG-PF, n=6). Letras iguais representam diferença estatística (test T) [a] p=0,0003, [b] p= 0,0002, [c] p= 0,014, [d] p= 0,0001, [e] p=0,0002, [f] p=0,02, [g]p=0,03.

A composição corporal dos animais é mostrada nas tabelas 10 e 11. As fêmeas HTG que foram submetidas ao regime de *paired feeding* apresentaram diminuição significativa na massa corporal total final quando comparadas as wild type alimentadas ad

libitum (WT- ad lib) e as HTG-ad lib (Tab. 10). O mesmo não foi observado nos machos submetidos ao mesmo tratamento (Tab. 11). Quanto à massa adiposa, observamos que as fêmeas HTG alimentadas ad lib apresentam redução do tecido adiposo visceral visível (perirrenal somado ao perigonadal) quando comparadas as WT-ad lib. Porém o regime de PF nas fêmeas não modificou significativamente a massa deste depósito adiposo. No entanto, nos machos HTG-PF verificamos um aumento significativo na massa relativa do tecido adiposo visceral visível em relação aos HTG-ad lib. A maioria dos estudos em animais controles submetidos à restrição calórica mostra redução ou preservação da adiposidade (Kim *et al.*, 2009, Hancock *et al.*, , 2011, Wang *et al.*, 2011). Por exemplo, Kim e colaboradores (2009) estudaram ratos Fischer 344 em restrição calórica de 40% em relação a controles ad libitum por 3 semanas e observaram manutenção da massa relativa do tecido adiposo branco. Entretanto, nossos achados, inesperados, de aumento de adiposo visceral nos camundongos machos HTG-PF poderiam ser explicados por um aumento da lipogênese neste tecido, conforme descrito por Bruss et al. (2009). Esses autores observaram aumento de lipogênese da ordem de 5 vezes no tecido adiposo subcutâneo e de 2 vezes no adiposo epididimal em machos C57Bl6 com restrição calórica de 30% durante 5 semanas.

Tabela 10. Composição corporal das fêmeas hipertrigliceridêmicas (HTG) e controles wild type (WT)

	WT- ad lib	HTG-ad lib	HTG-PF
Massa corporal total (g)	19,91 ± 0,42[a]	20,35 ± 0,29[b]	17,95 ± 0,54[a,b]
Adiposo visceral visível (% massa corporal)	0,95 ± 0,07[c]	0,61 ± 0,22[c]	0,79 ± 0,14
Adiposo subcutâneo visível (% massa corporal)	0,98 ± 0,08	0,95 ± 0,17	1,11 ± 0,19
Gordura (% carcaça)	4,52 ± 0,30	2,50 ± 0,85	3,75 ± 0,38
Massa magra (% carcaça)	30,69 ± 0,77	29,83 ± 0,44	30,32 ± 0,19
Água (% carcaça)	64,79 ± 1,05	67,67 ± 0,77	65,93 ± 0,45

Média ± epm. Fêmeas wild type *ad libitum* (WT-ad lib, n=5), hipertrigliceridêmicas *ad libitum* (HTG-ad lib, n=3) e hipertrigliceridêmicas em regime de *paired feeding* (HTG-PF, n=5). Adiposo visceral (soma dos tecidos adiposos peri-renal e perigonadal).Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos (test T) [a] p=0,02, [b] p=0,018, [c] p=0,03.

Tabela 11. Composição corporal dos machos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles wild type (WT).

	WT- ad lib	HTG-ad lib	HTG-PF
Massa corporal total (g)	23,18 ± 0,85	22,11 ± 0,65	21,26 ± 0,50
Adiposo visceral visível (% massa corporal)	1,10 ± 0,06	1,10 ± 0,03[a]	1,44 ± 0,13[a]
Adiposo subcutâneo visível (% massa corporal)	1,06 ± 0,13	0,91 ± 0,08	1,27 ± 0,15
Gordura (% carcaça)	3,29 ± 0,63	3,02 ± 0,51	5,21 ± 1,65
Massa magra (% carcaça)	33, 82 ± 1,03	33, 82 ± 1,47	31,81 ± 1,76
Água (% carcaça)	65,26 ± 0,35	65,40 ± 0,69	63,30 ± 1,56

Média ± epm . Machos *wild type ad libitum* (WT-ad lib, n=7), hipertrigliceridêmicos *ad libitum* (HTG-ad lib, n=7) e.hipertrigliceridêmicos em regime de *paired feeding* (HTG-PF, n=7). Adiposo visceral (soma dos tecidos adiposos peri-renal e perigonadal). Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos (test T) [a] p=0,05.

As curvas de crescimento dos grupos wild type e HTG ad lib e PF são apresentadas nas figuras 22A e 22B. O ganho de peso neste período, estimado como área incremental sob a curva ponderal nos 3 grupos está mostrado nas figuras 22C e 22D. Observamos um marcante efeito de redução de crescimento tanto em machos quanto em fêmeas HTG-PF em relação aos respectivos grupos ad lib. Portanto, nos animais HTG-PF a diminuição da ingestão alimentar (Fig 21) resultou em diminuição de crescimento, do ganho de peso, do peso corpóreo final (fêmeas), e preservação (nas fêmeas) ou aumento (em machos) da massa relativa do tecido adiposo visceral.

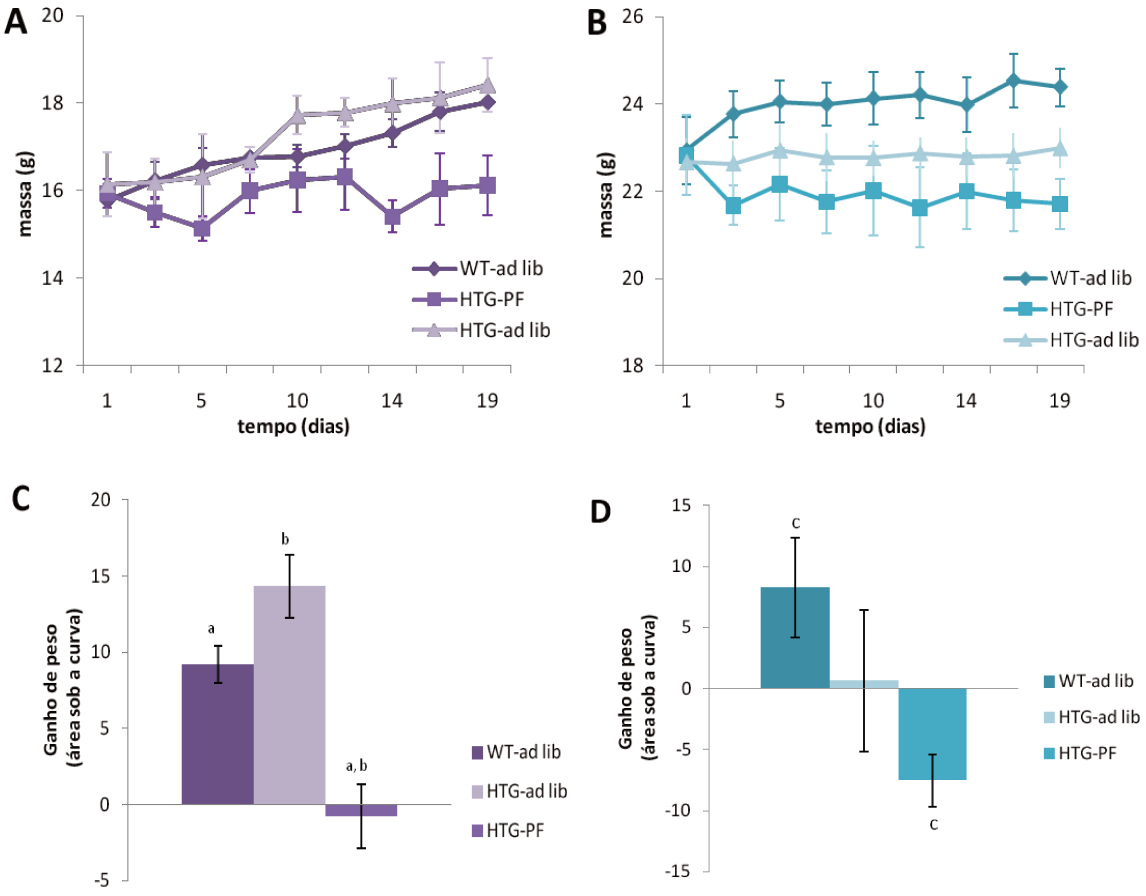


Figura 22. Curva de crescimento (A, B) e ganho de peso (C,D) de animais wild type (WT) e hipertrigliceridêmicos (HTG). (A,C) Fêmeas wild type ad libidum (WT-ad lib, n=5), hipertrigliceridêmicas ad libidum (HTG-ad lib, n=3) e hipertrigliceridêmicas em *paired feeding* (HTG-PF, n=5). (B,D) Machos wild type ad libidum (WT-ad lib, n=7), hipertrigliceridêmicos ad libidum (HTG-ad lib, n=7) e hipertrigliceridêmicos em *paired feeding* (HTG-PF, n=7). Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos (test T) $^{a}p=0,0035$, $^{b}p=0,01$, $^{c}p=0,04$.

Estudos anteriores de nosso grupo descreveram que nos animais hipertrigliceridêmicos ocorre aumento de metabolismo corporal (produção de CO_2) que pôde ser explicado bioquimicamente pelo aumento da atividade do canal mitocondrial de potássio sensível ao ATP (mitoKATP). A abertura deste canal desacopla as mitocôndrias aumentando a velocidade de respiração, sem correspondente síntese de ATP, resultando em dissipação de energia celular. No presente estudo verificamos que, a produção de CO_2 é maior em HTG-ad lib que em wild type-ad lib (Tab. 12), como no estudo anterior (Alberici *et al.*, 2009). O regime de *paired feeding* não alterou significativamente o aumento do metabolismo corporal das fêmeas HTG-PF (Fig 17A), porém nos machos HTG-PF, o aumento do metabolismo corporal foi totalmente corrigido para os níveis dos controles wild type-ad lib (Fig. 17B).

Tabela 12: Produção de CO_2 de animais hipertrigliceridêmicos (HTG) e wild type (WT).

	WT-ad lib	HTG-ad lib	HTG-PF
Fêmeas	$9,5 \pm 0,2^{a,b}$	$11,1 \pm 0,04^{b}$	$10,7 \pm 0,2^{a}$
Machos	$13,6 \pm 0,7^{c}$	$15,4 \pm 0,5^{c,d}$	$13,9 \pm 1,0^{d}$

Dados expressos em g CO_2/kg/h. Fêmeas wild type ad libidum (WT-ad lib, n=5), hipertrigliceridêmicas ad libidum (HTG-ad lib, n=3) e hipertrigliceridêmicas em paired feeding (HTG-PF, n=5). Machos wild type ad libidum (WT-ad lib, n=7), hipertrigliceridêmicos ad libidum (HTG-ad lib, n=7) e hipertrigliceridêmicos em paired feeding (HTG-PF, n=7). Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos (test T) $^{a}p=0,01$, $^{b}p=0,001$, $^{c}p=0,005$, $^{d}p=0,03$.

A atividade dos mitoKATP é estimada através do inchamento mitocondrial na ausência (canais abertos) e na presença (canais fechados) de ATP (Fig. 23). Verificamos que a atividade dos mitoKATP também estava aumentada tanto nas fêmeas como nos machos HTG-ad lib comparados aos wild type- ad lid (Fig. 23A e 23B, p=0,03 e p=0,05, respectivamente), como no estudo anterior (Alberici *et al.,* 2006). O regime de *paired feeding* não foi capaz de diminuir significativamente a atividade dos mitoKATP nas fêmeas (Fig. 23A), enquanto nos machos este tratamento reduziu a atividade dos mitoKATP (Fig. 23B).

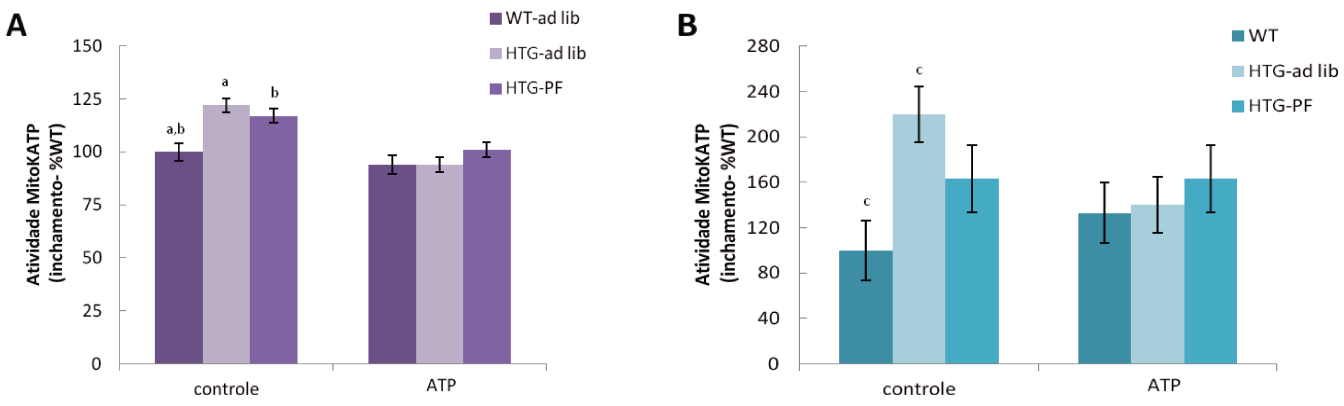


Figura 23. Atividade do canal de potássio sensível ao ATP de mitocôndrias isoladas de fígado de animais hipertrigliceridêmicos (HTG) e wild type (WT). A atividade estimada como inchamento mitocondrial na ausência (canais abertos) e na presença (canais fechados) de ATP. (A) Fêmeas *wild type* ad libitum (WT-ad lib,n=5), hipertrigliceridêmicas ad libitum (HTG-ad lib, n=4) e hipertrigliceridêmicas em regime de paired feeding (HTG-PF, n=3). (B) Machos *wild type* ad libidum (WT-ad lib, n=3), hipertrigliceridêmicos ad libidum (HTG-ad lib, n=3) e hipertrigliceridêmicos em paired feeding (HTG-PF, n=3). Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos (test T) $^{a}p=0,002$, $^{b}p=0,0004$, $^{c}p=0,004$, $^{d}p=0,0001$.

Em estudos prévios propusemos que a maior atividade dos mitoKATP era responsável pelo aumento do metabolismo corporal (Alberici *et al.*, 2006). Os resultados do presente trabalho reforçam fortemente esta proposição, uma vez que os dados de machos e fêmeas mostram correlação entre as respostas do metabolismo corporal (produção de CO_2) e da atividade do mitoKATP. Em machos, o paired feeding reduziu o metabolismo corporal e reduziu a atividade dos mitoKATP, enquanto nas fêmeas, o paired feeding não corrigiu o aumento do metabolismo corporal e não reduziu a atividade do mitoKATP. Em ambos os casos a restrição calórica causou um prejuízo do crescimento dos animais, no entanto só os machos, que fecharam o mitoKATP e reduziram a produção de CO_2, ganharam massa gorda.

As razões para as diferentes respostas de machos e fêmeas ao regime alimentar são desconhecidas e não foram estudadas no presente trabalho. Sabe-se a que a abertura destes canais é regulada por espécies reativas de oxigênio tanto *in vitro* (Facundo *et al.,* 2007,) como *in vivo* por estresse oxidativo extra-mitocondrial no fígado dos animais HTG (Alberici *et al.,* 2009). Poderíamos especular que a restrição calórica tenha neutralizado o estresse oxidativo hepático nos machos, mas não nas fêmeas. Isso poderia ser decorrente da maior captação tecidual de lipoproteínas ricas em TG nas fêmeas, tal qual ocorre em mulheres comparadas aos homens (Wang *et al.*, 2011). A suposta maior entrada de lípides no fígado das fêmeas seria responsável por maior estresse oxidativo tecidual neste gênero.

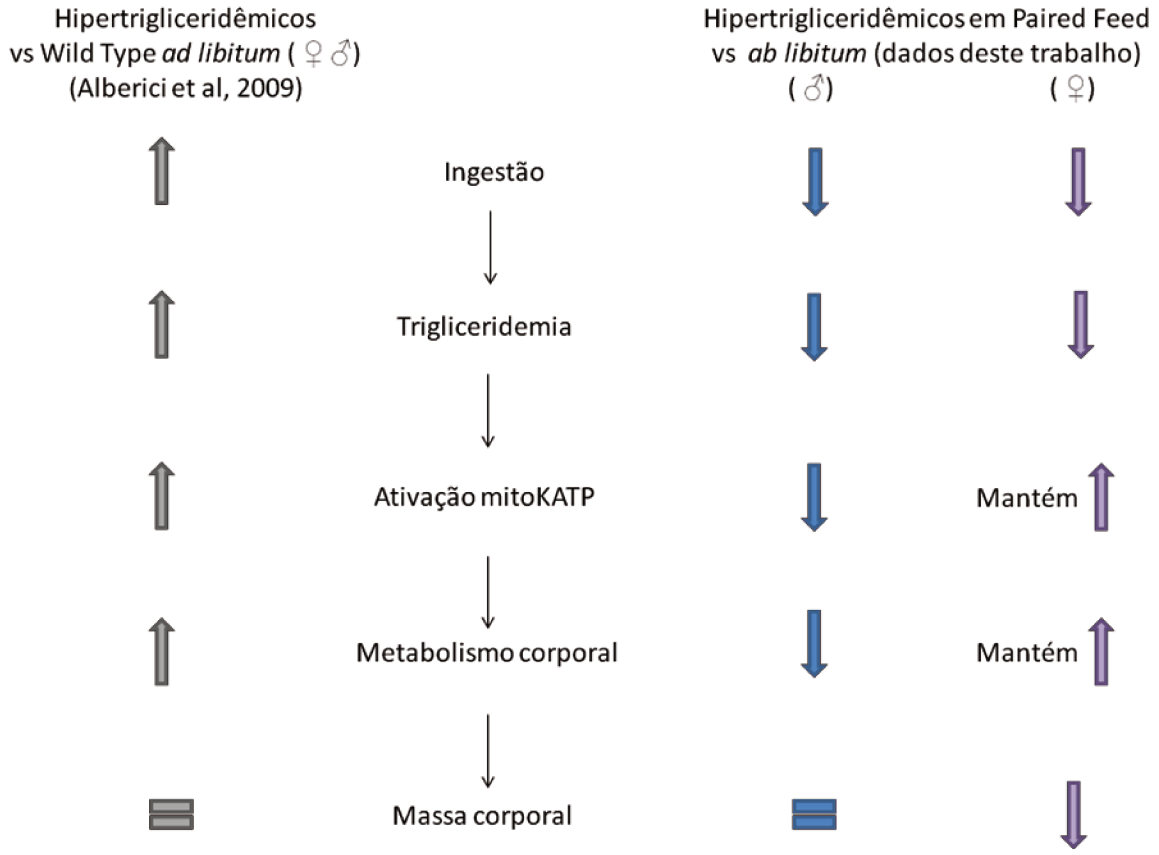


Figura 24. Participação da alimentação pareada no metabolismo de camundongos hipertrigliceridêmicos pela super-expressão da apo CIII.

Em síntese, neste trabalho mostramos que as dislipidemias genéticas podem alterar o metabolismo energético em camundongos. Especificamente mostramos que: 1) na via de sinalização AMPK-ACC, ocorreu ativação da AMPK em fígado de animais hipercolesterolêmicos por deficiencia do receptor de LDL. No entanto, na hipoalfalipoproteinemia, por aumento da expressão da CETP, não ocorre alteração do estado de ativação da AMPK. 2) Em animais hipertrigliceridêmicos existe uma associação entre o estado de atividade (abertura) dos canais mitocondriais de potássio sensíveis ao ATP e a taxa metabólica corporal; isto é, quando os canais permanecem abertos (fêmeas) o metabolismo corporal permanece aumentado, quando houve diminuição da atividade destes canais (fechamento) (machos) o metabolismo corporal foi reduzido até os níveis dos animais controles (wild type). Esses achados representam uma nova função destes canais na regulação do metabolismo energético corporal, uma vez que anteriormente os mesmos eram implicados na sinalização redox celular.

CONCLUSÕES

No presente estudo mostramos que as dislipidemias genéticas, *per se* (independente de obesidade), podem alterar o metabolismo energético de camundongos.

I- Estudo da ativação da AMPK e ACC em hipoalfalipoproteinêmicos por super-expressão da CETP:

Observamos uma redução significativa da massa relativa dos depósitos adiposos e aumento proporcional de massa magra nestes animais. Demonstramos que a sinalização da AMPK-ACC não está ativada em fígado e músculo e, portanto, o maior metabolismo corporal observado nestes animais deve estar sendo originado em outros tecidos do corpo. Resultados ainda não publicados de nosso grupo corroboram a proposição de que o tecido adiposo branco, e possivelmente o marrom, pode ser responsável pelo maior gasto energético global neste grupo.

II- Estudo da ativação da AMPK e ACC em animais hipercolesterolêmicos por deficiência de receptor de LDL:

Nossos achados mostram que nesta condição de deficiência de captação celular de colesterol exógeno, a AMPK está ativada no principal tecido esteroidogênico do corpo, o fígado, mas não no músculo esquelético, sem correspondente fosforilação (inibição) da enzima responsável pela lipogênese, a ACC. Isso sugere que deve haver um aumento de catabolismo de nutrientes não-lipídicos no fígado destes animais, para fornecimento de substratos para a síntese aumentada de colesterol e lipídeos neste órgão.

III- Efeito da alimentação pareada em animais hipertrigliceridêmicos (HTG) por super-expressão da apo CIII:

No presente estudo verificamos que animais HTG com alimentação pareada (restrição alimentar de 17%) apresentaram diminuição de crescimento corporal, do ganho de peso, do peso corpóreo final (em fêmeas), e manutenção (em fêmeas) ou aumento (em machos) da massa relativa do tecido adiposo visceral. Verificamos ainda que a alimentação pareada não foi capaz de normalizar o aumento de produção corporal de CO_2 nem o aumento da atividade do canal mitocondrial de potássio sensível ao ATP observados nas fêmeas, mas foi efetiva nos machos HTG. Assim, pode-se inferir que o

metabolismo corporal (produção de CO_2) reflete o aumento do metabolismo celular causado por aumento da atividade do mitoKATP que desacopla levemente as mitocôndrias e que estas adaptações são revertidas pela restrição alimentar nos machos mas não nas fêmeas HTG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aalto-Setälä K, Fisher EA, Chen X, Chajek-Shaul T, Hayek T, Zechner R, Walsh A, Ramakrishnan R, Ginsberg HN, Breslow JL. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. J Clin Invest. 1992; 90(5): 1889-900.

Alberici LC, Oliveira HC, Paim BA, Mantello CC, Augusto AC, Zecchin KG, GurgueiraSA, Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels as redox signals to liver mitochondria in response to hypertriglyceridemia. Free Radical Biology & Medicine. 2009; 47: 1432-1439.

Alberici LC, Oliveira HC, Patrício PR, Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Hyperlipidemic mice present enhanced catabolism and higher mitochondrial ATP-sensitive K+ channel activity. Gastroenterology. 2006; 131(4): 1228-34.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 120(16): 1640-5.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. Diabet Med. 2006; 23(5): 469-80.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. Lancet. 2005; 366(9491): 1059-62.

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med. 1998; 15(7): 539-53.

Amadeo GA, Rudolph MJ, Tong L. Crystal structure of the heterotrimer core of Saccharomyces cerevisiae AMPK homologue SNF1. Nature. 2007; 449(7161): 492-5.

Arad M, Seidman CE, Seidman JG. AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease. Circ Res. 2007; 100(4): 474-88.

Araújo EP, De Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Shortterm in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. Endocrinology. 2005; 146: 1428-37.

Bachorick PS, Levy, RI, Rifkind BM. –Lipids and dyslipoproteinemia. In: HENRY, J. B. – Clinical diagnoses management by laboratory methods. 18 ed. USA, W. B. Sauders Company, p.188-211, 1991.

Benetos A, Thomas F, Pannier B, Bean K, Jégo B, Guize L. All-cause and cardiovascular mortality using the different definitions of metabolic syndrome. Am J Cardiol. 2008; 102(2):188-91

Bentley-Lewis R, Koruda K, Seely EW. The metabolic syndrome in women. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2007; 3(10):696-704.

Berti JA, Amaral ME, Boschero AC, Nunes VS, Harada LM, Castilho LN, Oliveira HC. Thyroid hormone increases plasma cholesteryl ester transfer protein activity and plasma high-density lipoprotein removal rate in transgenic mice. Metabolism. 2001; 50(5):530-6.

Bessesen DH. Update on obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93(6):2027-34.

Brown MS and Goldstein JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer´s bottle to Scap´s MELADL. Journal of Lipid Research. 2009; 50:S15-S27.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science. 1986; 232(4746):34-47.

Brownsey RW, Boone AN, Elliot JE, Kulpa J, Lee WM. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. Biochem Soc Trans. 2006; 34(2): 223-7.

Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, Hellerstein MK. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010; 298(1): E108-16.

Calegario FF, Cosso RG, Fagian MM, Almeida FV, Jardim WF, Jezek P, Arruda P, Vercesi AE. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J Bioenerg Biomembr*. 2003; 35: 211–220.

Canto C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. Cell Mol Life Sci. 2010; 67(20): 3407-23.

Catenacci VA, Hill JO, Wyatt HR. The obesity epidemic. *Clin Chest Med*. 2009; 30(3): 415-44.

Cesquini M, Stoppa GR, Prada PO, Torsoni AS, Romanatto T, Saouza A, Saad MJ, Velloso LA, Torsoni MA. Citrate diminishes hypothalamic acetyl-CoA carboxylase phosphorylation and modulates satiety signals and hepatic mechanisms involved in glucose homeostasis in rats. Life Sci. 2008; 82(25-26): 1262-71.

Chapman MJ. Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease. Pharmacol Ther. 2006; 111: 893-908.

Chien M, Chien C, Hsiao L, Lin C, Yang C. – OxLDL induces mitogen-activated protein kinase activation mediated via Pl3-kinase/Akt in vascular smooth muscle cells. Journal of Lipid Research. 2003; 44: 1667-1675.

Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. Free Radic Biol Med. 2000; 28(12): 1815-26.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 2001; 285(19): 2486-97.

Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitve K+ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. Free Radic. Biol. Med. 2007; 42: 1039-1048.

Fan J, Watanabe T. Imflammatory reactions in the pathogeneses of atherosclerosis. *J. Atheros.thromb.* 2003; 10 (2): 63-71.

Fantino M. Role of lipids in the control of food intake. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2011; 14(2): 138-44.

Folmes CD, Lopaschuk GD. Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity. Cardiovasc Res. 2007; 73(2): 278-87.

Ginsberg HN, Truck C. Diabetes and dyslipidemia. Curr Diab Rep. 2001, 1:93-95

Ginter, E.; Simko, V. Adult obesity at the beginning of the 21st century: epidemiology, pathophysiology and health risk. Bratisl Lek Listy. 2008; 109(5): 224-30.

Gormand A, Henriksson E, Strom K, Jense TE, Sakamoto K, Goransson O. Regulation of AMP-activated protein kinase by LKB1 and CaMKK in adipocytes. J Cell Biochem. 2011; 112(5): 1364-75.

Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ; National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. Implications of

recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. Circulation. 2004; 110(2):227-39.

Ha J, Daniel S, Broyles SS, Kim KH. Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. J Biol Chem. 1994; 269(35): 22162-8.

Hancock CR, Han DH, Higashida K, Kim SH, Holloszy JO. Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. FASEB J. 2011; 25(2): 785-91.

Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. J Physiol. 2006; 574(Pt 1): 7-15.

Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8(10): 774-85.

Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JL, Tall AR. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. J Clin Invest. 1995; 96(4): 2071-4.

Haystead TA, Campebell DG, Hardie DG. Analysis of sites phosphorylated on acetyl-CoA carboxylase in response to insulin in isolated adipocytes. Comparison with sites phosphorylated by casein kinase-2 and the calmodulin-dependent multiprotein kinase. Eur J Biochem. 1998; 175(2): 347-54.

Heesom KJ, Moule SK, Denton RM. Purification and characterisation of an insulin-stimulated protein-serine kinase which phosphorylates acetyl-CoA carboxylase. FEBS Lett. 1998; 422(1): 43-6.

Herz J and Hamann U. Surface location and high affinity for calcium of a 500kd liver membrane protein closely related to the LSL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. Embo J.1988; 7(13): 4119-27.

Hession M, Rolland C, Kulkarni U, Wise A, Broom J. Systematic review of randomized controlled trials of low-carbohydrate vs. low-fat/low-calorie diets in the management of obesity and its comorbidities. Obes Rev. 2009; 10(1): 36-50.

Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDLR gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat. 1992; 1: 445-466.

Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J Clin Invest. 1993; 92(2):883-93.

James PT. Obesity: the worldwide epidemic. Clin Dermatol. 2004; 22(4): 276-80.

Janovská A, Hatzinikolas G, Staikopoulos V, McInerney J, Mano M, Wittert GA. AMPK and ACC phosphorylation: effect of leptin, muscle fibre type and obesity. Mol Cell Endocrinol. 2008; 284(1-2): 1-10.

Jansen M, Ten Klooster JP, Offerhaus GJ, Clevers H. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. Physiol Rev. 2009; 89(3): 777-98.

Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1290-1295.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell Metab. 2005; 1(1): 15-25.

Kim JY, Kim DH, Choi J, Park JK, Jeong KS, Leeuwenburg C, Yu BP, Chung HY. Changes in lipid distribution during aging and its modulation by calorie restriction. Age. 2009; 31(2): 127-42.

Kim K H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. Annu Rev Nutr. 1997; 17: 77-99.

Kim KH, López-Casillas F, Bai DH, Luo X, Pape ME. Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. FASEB J. 1989; 3(11): 2250-6.

Kim MS, Lee KU. Role of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase in the regulation of food intake and energy homeostasis. J Mol Med. 2005; 83(7): 514-20.

Koh HJ, Brandauer J, Goodyear LJ. LKB1 and AMPK and the regulation of skeletal muscle metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2008; 11(3): 227-32.

Kusunoki J, Kanatani A, Moller DE. Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome. Endocrine. 2006; 29(1): 91-100.

Lage R, Diéguez C, Vidal-Puig A, Lópes M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. Trends Mol Med. 2008; 14(12): 539-49.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature. 2011; 473(7347): 317-25.

Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. J Clin Invest. 2006; 116(7): 1776-83.

Mahley RW, Weisgraber KH, Mfarese RVJR –Disorders of lipid metabolism. In: WILSON,

J. D.; FOSTER, D. W.; KRONENBERG, H. M.; LARSEN, P. R. –Williams textbook of endocrinology. 9 ed. USA. W. B. Sauders Company, p. 1099-1153, 1998

Mantovani J, Roy R. Re-evaluating the general(ized) roles of AMPK in cellular metabolism. FEBS Lett. 2011; 585(7): 967-72.

Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. Nature. 1993; 364(6432): 73-5.

Munday MR, Milic MR, Takhar S, Holness MJ, Sugden MC. The short-term regulation of hepatic acetyl-CoA carboxylase during starvation and re-feeding in the rat. Biochem J. 1991; 280 (Pt 3): 733-7.

Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. Biochem Soc Trans. 2002; 30(Pt 6): 1059-64.

Oliveira HC, Chouinard RA, Agellon LB, Bruce C, Ma L, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. Cis-acting sequences mapped in transgenic mice. J Biol Chem. 1996; 271(50): 31831-8.

Oliveira HC, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Salerno AG, Dorighello GG, Velho JA, de Faria EC, Vercesi AE. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. FASEB J. 2005; 19(2): 278-80.

Osler ME, Zierath JR. Minireview: Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. Endocrinology. 2008; 149(3): 935-41.

Paim BA, Velho JA, Castilho RF, Oliveira HC, Vercesi AE. Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. Free Radic Biol Med. 2008; 44(3): 444-51.

Patrício, PR. A expressão da proteína de transferência de colesteril éster (CETP) modula a adiposidade e a expressão de genes envolvidos em lipólise e lipogênese. Tese de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Instituto de Biologia, UNICAMP, julho/2010.

Quintão ECR, Nakandakare ER and Passarelli M (editores). Lípides: do metabolismo à aterosclerose- São Paulo: Sarvier, 2011.

Rifai N, Bachorick PS, Alberts JJ – Lipids, Lipoproteins and Apolopoproteins. In: BURTES, C. A. & ASHWOOD, E. R. –Tietz textbook of Clinical Chemistry. 3 ed. USA. W. Sauders Company, p. 809-86, 1999.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990. *Nature.*1993; 362: 801-809.

Rutter GA, da Silva Xavier G, Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homoeostasis. Biochem J. 2003; 375(Pt 1): 1-16.

Rutter GA, Leclerc I. The AMP-regulated kinase family: enigmatic targets for diabetes therapy. Mol Cell Endocrinol. 2009; 297(1-2): 41-9.

Saggerson D. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. Annu Rev Nutr. 2008; 28: 253-72.

Salerno AG, Silva TR, Amaral ME, Alberici LC, Bonfleur ML, Patrício PR, Francesconi EP, Grassi-Kassisse DM, Vercesi AE, Boschero AC, Oliveira HC. Overexpression of apolipoprotein CIII increases and CETP reverses diet-induced obesity in transgenic mice. Int J Obes. 2007; 31(10): 1586-95.

Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. Biochem J. 2007; 403(1): 139-48.

Schimmack G; Defronzo RA; Musi N. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. Diabetes Obes Metab. 2006; 8(6): 591-602.

Schreurs M, Kuipersv F, Vanderlei FR. Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. Obes Rev. 2010; 11(5): 380-8.

Schwatrz CJ, Valente AJ, Sprague EA. – A moderm view of atherosclerosis. Am. J. Cardiol. 1993; 7: 9B-14B.

Speakman JR. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr.* 2004; 134(8 Suppl): 2090-105.

Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001; 104(4): 531-43.

Steemburgo T, Dall'Alba V, Gross JL, Azevedo MJ. Dietary factors and metabolic syndrome. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007; 51(9): 1425-33

Steinberg GR. Role of the AMP-activated protein kinase in regulating fatty acid metabolism during exercise. Appl Physiol Nutr Metab. 2009; 34(3): 315-22.

Steinberg GR; Kemp BE. AMPK in Health and Disease. Physiol Rev. 2009; 89(3):1025-78.

Tall AR. Plasma lipid transfer proteins. Annu Rev Biochem. 1995; 64: 235-57.

Ten S, Maclaren N. Insulin resistance syndrome in children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004*;* 89(6): 2526-39.

Thampy KG; Wakil SJ. Activation of acetyl-CoA carboxylase. Purification and properties of a Mn2+-dependent phosphatase. J Biol Chem. 1985; 260(10): 6318-23.

Thomson DM, Winder WW. AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. Acta Physiol. 2009; 196(1): 147-54.

Townley R, Shapiro L. Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. Science. 2007; 315(5819): 1726-9.

Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 12490-5.

Viollet B, Athea Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. Front Biosci. 2009; 14: 19-44.

Wakil SJ; Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. J Lipid Res. 2009; 50 Suppl: S138-43.

Wang X, Magkos F, Mittendorfer B. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: it´s not just about sex hormones. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96(4): 885-893.

Winder WW, Wilson HA, Hadrie DG, Rasmussen BB, Hutber CA, Call GB, Clayton RD, Conley LM, Yoon S, Zhou B. Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. J Appl Physiol. 1997; 82(1): 219-25.

Witcazk CA, Sharoff CG, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. Cell Mol Life Sci. 2008; 65(23): 3737-55.

Zhao R, Shen GX - Functional modulation of antioxidant enzymes in vascular endothelial cells by glycated LDL. Atherosclerosis. 2005; 179: 277-284.

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Cronologia do estudo da AMPK 16
Figura 2. Complexo enzimático da AMPK. 17
Figura 3. Ativação da AMPK por diferentes mecanismos. 18
Figura 4. Vias de atuação da AMPK fosforilada. 19
Figura 5. Regulação da acetil-CoA carboxilase (ACC) por efetores alostéricos e por fosforilação 20
Figura 6. Regulação da oxidação lipídica no músculo esquelético pela AMPK. 21
Figura 7. Estado de ativação da AMPK no fígado em fêmeas wild type (WT) e hipoalfalipoproteinêmicas (CETP). 33
Figura 8. Estado de ativação da ACC no fígado em fêmeas wild type (WT) e hipoalfalipoproteinêmicas (CETP). 34
Figura 9. Estado de ativação da AMPK no tecido muscular (sóleo) em fêmeas wild type (WT) e hipoalfalipoproteinêmicas (CETP). 35
Figura 10. Estado de ativação da ACC no músculo em fêmeas wild type (WT) e hipoalfalipoproteinêmicas (CETP). 36
Figura 11. Participação da via da AMPK-ACC no metabolismo lipídico do fígado, músculo e adiposo de camundongos hipoalfalipoproteinêmicos por super-expressão da CETP. 37
Figura 12. Estado de ativação da AMPK no fígado em fêmeas wild type (WT-F) e hipercolesterolêmicas (R0-F). 40
Figura 13. Estado de ativação da ACC no fígado em fêmeas wild type (WT-F) e hipercolesterolêmicas (R0-F). 41
Figura 14. Estado de ativação da AMPK no fígado em machos wild type (WT-M) e hipercolesterolêmicos (R0-M) 42
Figura 15. Estado de ativação da ACC no fígado em machos wild type (WT-M) e hipercolesterolêmicos (R0-M) 43
Figura 16. Estado de ativação da AMPK no tecido muscular (sóleo) em fêmeas wild type (WT-F) e hipercolesterolêmicas (R0-F). 44
Figura 17. Estado de ativação da ACC no tecido muscular (sóleo) em fêmeas wild type (WT-F) e hipercolesterolêmicas (R0-F). 45

Figura 18. Estado de ativação da AMPK no tecido muscular (sóleo) em machos wild type (WT-M) e hipercolesterolêmicos (R0-M)..... 46
Figura 19. Estado de ativação da ACC no tecido muscular (sóleo) em machos wild type (WT-M) e hipercolesterolêmicos (R0-M)..... 47
Figura 20. Modelo proposto para explicar ativação da AMPK em fígado de camundongos hipercolesterolêmicos 48
Figura 22. Curva de crescimento (A, B) e ganho de peso (C,D) de animais wild type (WT) e hipertrigliceridêmicos (HTG)..... 53
Figura 23. Atividade do canal de potássio sensível ao ATP de mitocôndrias isoladas de fígado de animais hipertrigliceridêmicos (HTG) e wild type (WT). 55
Figura 24. Participação da alimentação pareada no metabolismo de camundongos hipertrigliceridêmicos pela super-expressão da apo CIII. 56

Tabela 1. Definições da síndrome metabólica 13
Tabela 2. Massa corporal e adiposa das fêmeas hipoalfalipoproteinêmicas (CETP) e wild type (WT). 31
Tabela 3. Concentrações plasmáticas de lipídeos e glicose em fêmeas hipoalfalipoproteinêmicas (CETP) e wild type (WT)..... 32
Tabela 4. Massa corporal e adiposa das fêmeas hipercolesterolêmicas (R0) e wild type (WT)..... 38
Tabela 5. Massa corporal e adiposa dos machos hipercolesterolêmicos (R0) e wild type (WT)..... 38
Tabela 6**.** Concentrações plasmáticas de lipídeos e glicose em fêmeas hipercolesterolêmicas (R0) e wild type (WT). 39
Tabela 7. Concentrações plasmáticas de lipídeos e glicose em machos hipercolesterolêmicos (R0) e wild type (WT). 39
Tabela 8. Concentrações plasmáticas de lipídeos em fêmeas controles wild type (WT-ad lib), hipertrigliceridêmicas ad libitum (HTG- ad lib) e em regime de alimentação pareada (HTG-PF). 50
Tabela 9. Concentrações plasmáticas de lipídeos em machos controles wild type (WT-ad lib), hipertrigliceridêmicos ad libitum (HTG- ad lib) e em regime de alimentação pareada (HTG-PF). 50

Tabela 10. Composição corporal das fêmeas hipertrigliceridêmicas (HTG) e controles wild type (WT) 51
Tabela 11. Composição corporal dos machos hipertrigliceridêmicos (HTG) e controles wild type (WT). 52
Tabela 12: Produção de CO_2 de animais hipertrigliceridêmicos (HTG) e wild type (WT).. 54

UNICAMP

Of. CIBio/IB 06/2008

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
26 de maio de 2008.

Prof. Dr. EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO
Chefe do Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Biologia
Unicamp

Prezado Professor:

Informamos que o projeto abaixo relacionado, envolvendo OGM do tipo I, sob responsabilidade da **Profa. Dra. Helena C. F. Oliveira**, protocolado sob o número **2008/02**, foi aprovado pela CIBio-IB/Unicamp em Reunião Ordinária realizada no dia 26 de maio de 2008 e para ser desenvolvido nas dependências do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp:

No. Projeto (data da aprovação)	Data de recepção	Nome do Projeto	Prazo para envio de relatório à CIBio
CIBio 2008/02 (26/05/2008)	22/04/2008	Repercussão de modificações da expressão de proteínas envolvidas no transporte de lípides sobre o metabolismo de lípides e carboidratos, estresse oxidativo e adiposidade em camundongos geneticamente modificados	Fevereiro de 2009 (ref. período 1/1/2008 a 31/12/2008)

Recomendamos que sejam observadas as instruções normativas referentes a transporte e contenção da OGMs, disponíveis na webpage da CTNBio <www.ctnbio.gov.br>.

Atenciosamente,

Cordiais Saudações,

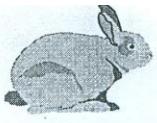
CÓPIA

Profa. Dra. **MARIA SILVIA VICCARI GATTI**
CIBio/IB-Unicamp

Cópias: *Profa. Dra. Helena C. F. Oliveira*

CIbio/IB-Unicamp
Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - Unicamp
Caixa Postal 6109 - 13083-970 Campinas SP
Tel.: (19) 3521-6359 – e-mail: comisib@unicamp.br

UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1601-1**, sobre **"Participação da AMPK nas alterações do metabolismo energético de camundongos geneticamente dislipidêmicos"**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira / Larissa Sayuri Kato**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **15 de setembro de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1601-1**, entitled **"Contribution of AMPK in the alterations of energetic metabolism in genetically dyslipidemic mice"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 15, 2008**.

Campinas, 25 de setembro de 2008.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/