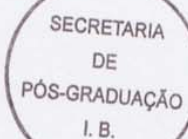
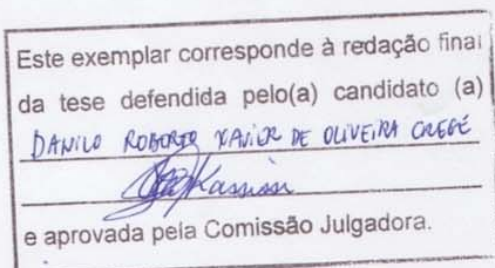


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



DANILO ROBERTO XAVIER DE OLIVEIRA CREGE

IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE ESTUDO FUNCIONAL DE
ADIPÓCITOS ISOLADOS DE TECIDO ADIPOSEO VISCERAL
DE HUMANOS EUTRÓFICOS E QUANTIFICAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE LACTATO



Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse

UNIDADE IB
Nº CHAMADA: T/UNICAMP C861i
V. EX.
TOMBO BCCL 74292
PROC 1615-07
C D X
PREÇO 110
DATA 25/09/07
BIB-ID

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C861i

Crege, Danilo Roberto Xavier de Oliveira
Implantação da técnica de estudo funcional de
adipócitos isolados de tecido adiposo visceral de humanos
eutróficos e quantificação da produção de lactato / Danilo
Roberto Xavier de Oliveira Crege. – Campinas, SP: [s.n.],
2007.

Orientadora: Dora Maria Grassi-Kassisse.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tecido adiposo. 2. Eutróficos. 3. Lactatos. I.
Grassi-Kassisse, Dora Maria. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Adipocytes isolation procedure of lean visceral adipose tissue and
qualification of lactate production.

Palavras-chave em inglês: Adipose tissues; Lean; Lactates.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Dora Maria Grassi-Kassisse, Eliana Cotta de Faria, Elisangela Farias
Silva.

Data da defesa: 09/02/2007.

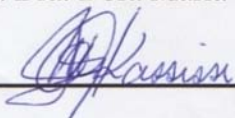
Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 2007

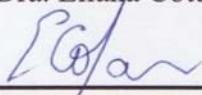
Data da Defesa: 09 de Fevereiro de 2007

BANCA EXAMINADORA:

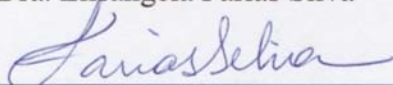
Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse (Orientadora)



Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria



Profa. Dra. Elisângela Farias Silva



Prof. Dr. Francesco Langone

Prof. Dr. Bruno Geloneze Neto

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre apoiaram minhas escolhas e me deram oportunidade de estudar para conseguir chegar até aqui. Não tenho palavras para agradecer e dizer o quanto são importantes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Não gostaria de ser injusto com ninguém neste momento de agradecer as pessoas que ao longo dos anos participaram da minha vida e que com certeza contribuíram de alguma forma para realização desta etapa. Desculpem-me se por descuido esquecer de alguém!

Durante estes anos que passei no Laboratório de Estudos do Estresse (LABEEST) só tenho a agradecer as novas amizades que foram feitas com pessoas que tornam o ambiente de trabalho extremamente agradável, e estão sempre dispostas a ajudar. Alexandre, Aline(s), André, Aglécio, Danuza, Débora, Edgar, Edla, Elaine, Elisângela, Geruza, Guto, Heder, Heloísa, Iraídes, Juliana, Karina, Márcia, Maria Cândida, Marília, Sílvia, Tim, Vivi. A todos vocês deixo aqui o meu muito obrigado!!!

A dupla Elaine “Cristina” e Ju, que mesmo acima na pirâmide, me ensinaram grande parte das técnicas do laboratório e me agüentaram nestes anos solucionando as inúmeras dúvidas que surgiram.

Aos “jovens” da base da pirâmide (Brincadeira!!!) Débora “Sanches”, Danuza, Aline, Guto. Companheiros de longos dias no laboratório que se desdobram para conseguir ajudar em tantos experimentos mesmo com todas as suas outras obrigações.

Ao meu grande amigo Edgar, a primeira pessoa do laboratório que acompanhei em experimento e que demonstra uma dedicação incrível na realização do seu trabalho e possui um talento ímpar para montar apresentações. Claro que não poderia deixar de citar também, o fato de ter sido o único, juntamente comigo, presente naquele famoso almoço do “Dia do Amigo”, mas tudo bem. Vocês estão perdoados!!!!

Ao Alexandre, companheiro de altos papos entre uma cerveja e outra nos finais de tarde. Uma pessoa que ao longo destes anos me ajudou muito tanto no laboratório, mas também colaborou demais na minha formação profissional fora dele. É um amigo que serei eternamente grato.

Ao meu “filho” Heder Frank “Starling”. Apesar de ter que cuidar muito do cidadão honorário de Tanabi, é um excelente companheiro de trabalho, sempre bem humorado, parceiro de inúmeros eventos e que merece muito mais do que já conseguiu.

A “Tia” Edla, na minha opinião a mais figura do laboratório, que ainda agüenta esse monte de “sobrinhos”. Um exemplo de dedicação, vontade de aprender e bom humor, que adorei conhecer.

A Karina, amiga de outros carnavais, e que tive o prazer de trabalhar nestes anos. Companheira de divertidas tardes nos computadores do laboratório e conselheira nas horas difíceis.

Não poderia esquecer de uma grande amiga: Márcia (MC Garcia!!!!) que carinhosamente me abriga na ponta esquerda de seu coração. Pessoa extremamente competente, dotada de um conhecimento científico notável. Grande companheira de papo e de copo nos eventos do laboratório!!

Aos amigos dos outros laboratórios que sempre estiveram dispostos a ajudar nos momentos difíceis, mas que também estiveram presentes durante as festas do departamento. Amarilys, Carol, Adriana, Zé, Leandro, Anderson, Fabi, Alexandre, André, Fer Hussein, Rafa, Emilianne, Bread, Romântico, Gi, Mércia, Claudinha, Leda, Alessandrino, Urso, Mandrake, Letícia, Helena, Eliane, Fabrizio, deixo aqui o meu muito obrigado.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica: Alexandra, Léscio, Marcelo, Washington, Dona Zefa, Seu Chico, Lu, Ivo.

A Andréa e a Marina que nestes anos atenderam milhares de ligações minhas para tirar dúvidas, mas sempre tiveram paciência de sobra e boa vontade para me ajudar.

Aos amigos de infância Rafael e Alan que há anos acompanham as diversas etapas da minha vida e com os quais gostaria de dividir mais uma vez a alegria por ter conseguido atingir meu objetivo.

Aos amigos do ETECAP. Durante todos estes anos de convívio ainda me divirto cada vez que encontro com vocês mesmo nas visitas surpresas às 11 horas da noite.

A todos da Fisioterapia da Puccamp, professores, funcionários, veteranos, “bixos”, um lugar que sem dúvidas passei os melhores anos de minha vida. Ao pessoal da turma 28, amigos que levarei para sempre: Pato, Duzão, Mococa, João, Milhão, Sato, Cacá, Rafa, Tenista, Duzinho, Gui, Dyna, Fer Santos, Déia, Ju, Mary Jane, Anna, Paulets, Renatinha..... e todos os outros 70 amigos que fiz nesta classe, muito obrigado por fazerem parte de minha vida.

As amigas ausentes Fer Redondo e Milla que infelizmente nos deixaram muito cedo, mas que com certeza estão em algum lugar olhando e torcendo por mim. Vocês fazem muita falta.

A turma 00 Noturno da Educação Física da Unicamp, aos professores e amigos. Muito obrigado por todos os momentos que passamos juntos nestes anos de graduação. Ao pessoal da Equipe 1: Zé Renan, Poses, Gui, Aragon, Alexei, Malu, Giu, Ylanão, Caiçara, Valéria. Foi bom demais estes 5 anos que estudamos juntos e pelas divertidas noites no quiosque. Agradeço pelos inúmeros favores que vocês fizeram por mim.

A Melissa que teve paciência e me apoiou para realizar este mestrado. Tenho um carinho muito grande por você que sempre será uma pessoa especial em minha vida.

Ao meu grande amigo Rodrigo “Pato” companheiro de muitos momentos difíceis e outros tantos de alegria. Apesar da distância que hoje nos separa tenho certeza de que nossa amizade vai ser eterna.

A galera do Chupim, amigos de verdade que não dispensam uma boa bagunça, mas também estão presentes quando as dificuldades aparecem. Muito obrigado!!! “Pra dar volta no trio...”.

Aos amigos que aparecem no meio do caminho e que tornam a vida muito mais agradável: Nucci, Giuliano, Casa dos 10, Samba de Resposta, Gazzetta, Cotoco, Pessoal das 2 Marias, Pateta, Aruan, Rafa Lemão...

A toda minha família: Tios, primos, avós,... e em especial meus pais, meu irmão Pedro, Rita, por tudo que já fizeram por mim, pelo carinho, amor e paciência. Sem vocês não teria conseguido.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica pela dedicação e conhecimentos passados nestes anos.

A toda equipe do Hospital Estadual de Sumaré, especialmente o Dr. Henrique José Silveira que foi fundamental para realização deste trabalho.

Ao Professor Francesco Langone que me proporcionou o primeiro contato com esta área fascinante que é a Fisiologia. Sou muito grato a você que sempre ajudou quando precisei com uma dedicação exemplar.

A Professora Regina Célia Spadari-Bratfisch, um exemplo de competência e seriedade nos trabalhos realizados. A dedicação e envolvimento com a fisiologia

demonstrada nestes anos que estive no laboratório servirão de inspiração por toda minha vida. Agradeço muito por toda ajuda e conhecimento proporcionado. Não podia deixar de agradecer também a introdução daquele conceito que jamais esquecerei: Resiliência!!

A Professora Dora Maria Grassi-Kassisse. Não sei como te agradecer por tudo que fez por mim nestes anos de laboratório, desde o momento que me recebeu, com todo carinho, até agora no fim dessa etapa. Muito obrigado pela atenção, dedicação, paciência e vontade de ensinar que sempre demonstrou comigo. Agradeço com toda sinceridade o conhecimento passado e a confiança depositada em mim, de uma pessoa que ensinou a importância de ser não apenas um professor, mas um educador. Muito Obrigado!

Ao CNPq e a FAPESP que financiaram esta pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O tecido adiposo como órgão endócrino.....	1
1.2 Os diferentes tipos de tecido adiposo: Branco e Marrom.....	1
1.3 Papel dos adrenoceptores no tecido adiposo.....	3
1.4 Produção de lactato pelo tecido adiposo.....	5
1.5 A produção de adipocinas pelo tecido adiposo.....	6
1.6 Isolamento de adipócitos.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Sujeitos Experimentais.....	13
3.2 Isolamento de Adipócitos.....	14
3.3 Contagem das Células.....	15
3.4 Estudo Farmacológico.....	17
3.5 Determinação do Glicerol no Meio de Incubação.....	18
3.6 Determinação do Lactato no Meio de Incubação	19
3.7 Análise Estatística.....	20

4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMO

O estudo da célula adiposa como entidade funcional do tecido adiposo iniciou-se quando Rodbell em 1964 descreveu a técnica de isolamento de adipócitos de tecido adiposo de ratos e apresentou os efeitos de hormônios no metabolismo de glicose e na lipólise destas células. A partir de então, numerosos são os artigos descrevendo a quantificação de diferentes receptores, bem como, os mensageiros envolvidos com a ativação dos mesmos em célula adiposa. A maioria dos estudos é baseada nesta primeira descrição de Rodbell, entretanto, estes apresentam algumas modificações. Para ensaios provenientes de adipócitos de humanos, a citação também se refere a Rodbell com modificações. O estudo do funcionamento da célula adiposa nas diferentes espécies é emergente, devido à presença na população ocidental da obesidade como pandemia. Além disto, o ensaio de adipócitos isolados de tecido adiposo humano é uma importante ferramenta para estudos farmacológicos de novos fármacos. Frente ao exposto, os objetivos deste trabalho foram implantar a técnica do estudo funcional de adipócitos isolados de tecido adiposo visceral de humanos eutróficos quantificando a produção de glicerol e lactato pelos adipócitos isolados de mulheres eutróficas (M: $49,0 \pm 6,1$ anos; IMC: $22,1 \pm 1,1$ Kg/m², n=5) e de homens (H: $46,0 \pm 4,5$ anos; IMC: $21,7 \pm 0,61$ Kg/m², n= 16). O tecido adiposo visceral foi retirado durante cirurgia gástrica e os adipócitos foram isolados de acordo com o procedimento original de Rodbell com algumas modificações. Os adipócitos foram incubados com noradrenalina (Nor: 0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M e 1 μ M) ou com noradrenalina na presença de prazosin (Pzs: 1 μ M). Os resultados estão expressos em médias $\pm$ EPM. As análises estatísticas foram realizadas com o teste *t* de Student e área sob a curva ($p < 0,05$).

Os adipócitos isolados do tecido adiposo de homens mostraram uma produção de glicerol maior quando comparada com a produção de glicerol dos adipócitos isolados de mulheres, tanto para valores basais (H: $0,3409 \pm 0,06$ vs M: $0,1557 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células.60min.}$ $p<0,05$) quanto para a lipólise estimulada ($0,001 \mu\text{M}$, H: $0,5053 \pm 0,06$ vs M: $0,1842 \pm 0,03$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células.60min.}$; $0,01 \mu\text{M}$, H: $0,6084 \pm 0,10$ vs M: $0,2945 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células.60min.}$; $0,1 \mu\text{M}$, H: $0,7632 \pm 0,14$ vs M: $0,3368 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células.60min.}$ $p<0,05$). Entretanto, a quantidade de lactato liberada tanto nos valores basais (H: $0,0990 \pm 0,01$; M: $0,1168 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células.60min.}$) quanto na incubação dos adipócitos com noradrenalina não mostrou diferenças significativas entre os gêneros quando analisada pelo teste *t* de Student, mas que surgiram na análise da área sob a curva. Nas condições utilizadas em neste estudo, o prazosin inibiu a produção de lactato estimulada pela noradrenalina apenas na concentração $0,1 \mu\text{M}$ em mulheres (Nor: $0,3111 \pm 0,03$ vs Nor + Pzs: $0,1856 \pm 0,03$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células.60min.}$ $p<0,05$). Nossos resultados mostram que a técnica de isolamento está implantada e sugerem que pode haver diferenças entre os gêneros na quantidade de adrenoreceptores α_1 relacionados com a produção de lactato em adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos eutróficos.

ABSTRACT

The study of adipose cell as a functional unit of the adipose tissue, began when Rodbell in 1964 described the adipocytes isolation procedure of rat adipose tissue, and showed the effects of hormones in the metabolism of glucose and in lipolysis of these cells. Since that, a great number of researches describing the number of adrenoceptors as well the molecular mechanisms involved with the activation of these receptors has been published. Almost all studies use this first description of Rodbell, however with some modifications. The isolation procedure to human adipocytes also refer the Rodbell's original procedure with modifications. The functional study of adipose tissue in different species is emerging due the presence of obesity as a pandemic problem in occidental population. Beside this, the isolation of adipocytes from the adipose tissue is an important tool to new pharmacological studies of novel drugs. Considering this background, the aim of this work was to implement the adipocytes isolation procedure from the visceral adipose tissue of lean humans and to show the glycerol and lactate production by isolated adipocytes of lean women (F: 49.0 ± 6.1 year old; BMI: 22.1 ± 1.1 Kg/m², n=5) and men (M: 46.0 ± 4.5 year old; BMI: 21.7 ± 0.61 Kg/m², n= 16). Visceral adipose tissue was collected during gastric surgery, and the adipocytes were isolated following Rodbell's original procedure with modifications. Adipocytes were incubated with noradrenaline (Nor: 0.001 μ M, 0.01 μ M, 0.1 μ M and 1 μ M) or noradrenaline (same concentrations) plus prazosin (Pzs: 1 μ M). Results are presented as means $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed by Student *t* test and area under curve ($p < 0.05$). Adipocytes isolated of men showed higher glycerol production when compared with adipocytes isolated of women, both basal (M: 0.3409 ± 0.06 vs F:

$0.1557 \pm 0.01 \mu\text{mol}/10^6\text{cells}.60\text{min}$, $p < 0.05$) and stimulated ($0.001 \mu\text{M}$, M: 0.5053 ± 0.06 vs F: $0.1842 \pm 0.03 \mu\text{mol}/10^6\text{cells}.60\text{min}$; $0.01 \mu\text{M}$, M: 0.6084 ± 0.10 vs F: $0.2945 \pm 0.01 \mu\text{mol}/10^6\text{cells}.60\text{min}$; $0.1 \mu\text{M}$, M: 0.7632 ± 0.14 vs F: $0.3368 \pm 0.01 \mu\text{mol}/10^6\text{cells}.60\text{min}$. $p < 0.05$). However, the amounts of basal (M: 0.0990 ± 0.01 ; F: $0.1168 \pm 0.02 \mu\text{mol}/10^6\text{cells}.60\text{min}$) and stimulated lactate production were similar in both genders when performed Student's *t* test but were different in area under curve analyses. Under the conditions used here Pzs induced a significant reduction on lactate production induced by $0.1 \mu\text{M}$ only in lean women (Nor: 0.3111 ± 0.03 vs Nor + Pzs: $0.1856 \pm 0.03 \mu\text{mol}/10^6\text{cells}.60\text{min}$. $p < 0.05$). Our results showed that the adipocytes isolation procedure was implemented and suggest that it is possible to have gender difference in amounts of alpha 1 adrenoceptors related with lactate production in adipocytes isolated from visceral fat pad of lean humans.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina Difosfato

AMPC – Adenosina Monofosfato Cíclico

ATP – Adenosina Trifosfato

BGH – Liberação basal de glicerol em homens

BGM - Liberação basal de glicerol em mulheres

BGT - Liberação basal de glicerol em todos os indivíduos

BLH - Liberação basal de lactato em homens

BLM - Liberação basal de lactato em mulheres

BLT - Liberação basal de lactato em todos os indivíduos

dL – Decilitros

EPM – Erro padrão da média

g – Gramas

°C – Graus Celsius

G_i – Proteína G inibitória

G_s – Proteína G estimulatória

H – Homens

HSL – Lípase hormônio sensível

IL-6 – Interleucina-6

IMC – Índice de massa corpórea

Kg – Quilograma

KRBA – Krebs Ringer Bicarbonato Albumina

KR-HEPES - Krebs Ringer Hepes

m – Metros

M – Molar

(M) – Mulheres

mg – Miligramas

mL – Mililitros

mM - Milimolar

nm – Nanômetros

PKA – Proteína quinase A

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

UCP – *Uncoupling proteins* (proteínas desacopladoras)

μ g – Microgramas

μ L – Microlitros

μ mol - Micromol

μ M – Micromolar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de sobrepeso e da obesidade de acordo com base no índice de massa corporal (IMC), onde $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{altura (m)}^2$	13
Tabela 2 - Idade (anos) e Índice de Massa Corporal ($IMC = \text{kg/m}^2$) dos indivíduos analisados.....	21
Tabela 3 - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/L) e colesterol total (mg/dL) dos indivíduos analisados.....	22
Tabela 4 - Liberação de basal de glicerol ($\mu\text{mol}/10^6\text{células.60 min.}$) e após o tratamento “Gelo” dos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos eutróficos.....	24
Tabela 5 - Liberação de glicerol basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6\text{células.60 min.}$) por diferentes concentrações de noradrenalina pelos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos.....	28
Tabela 6 - Liberação de glicerol basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6\text{células.60 min.}$) por diferentes concentrações de noradrenalina na presença de prazosin ($1\mu\text{M}$) pelos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos.....	29
Tabela 7 - Área sob a curva para liberação de glicerol ($\mu\text{mol}/10^6\text{células.60 min.}$) na presença de diferentes concentrações de noradrenalina ($0,001\mu\text{M}$ a $1\mu\text{M}$) de homens ($n = 7$) e de mulheres ($n = 4$) e de noradrenalina na presença de prazosin ($1\mu\text{M}$) de homens ($n = 6$) e de mulheres ($n = 4$).....	31

Tabela 8 - Liberação de basal de lactato ($\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{ min.}$) e após o tratamento “Gelo” dos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos eutróficos.....	32
Tabela 9 - Liberação de lactato basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{ min.}$) por diferentes concentrações de noradrenalina pelos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos.....	36
Tabela 10 - Liberação de lactato basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{ min.}$) por diferentes concentrações de noradrenalina na presença de prazosin ($1\mu\text{M}$) pelos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos.....	39
Tabela 11 - Área sob a curva para liberação de lactato ($\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{ min.}$) na presença de diferentes concentrações de noradrenalina ($0,001\text{ }\mu\text{M}$ a $1\text{ }\mu\text{M}$) de homens ($n = 7$) e de mulheres ($n = 4$) e de noradrenalina na presença de prazosin ($1\text{ }\mu\text{M}$) de homens ($n = 5$) e de mulheres ($n = 4$).....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Câmara de <i>Mallassez</i> contendo adipócitos isolados para realização da contagem. Imagem obtida de microscópio óptico em aumento de 50 vezes.....	16
Figura 2 - Liberação de glicerol em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de homens (n = 7).....	25
Figura 3 - Liberação de glicerol em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de mulheres (n = 4).....	26
Figura 4 - Liberação de glicerol em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de todos os indivíduos analisados (n = 11).....	27
Figura 5 - Comparação da liberação de glicerol em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral dos homens (n = 7) e das mulheres (n = 4) analisados.....	27
Figura 6 - Comparação da liberação de glicerol em resposta à noradrenalina na presença de prazosin (1 μ M) de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral dos homens (n = 6) e das mulheres (n = 4) analisadas.....	30
Figura 7 - Liberação de lactato em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de homens (n = 7).....	33
Figura 8 - Liberação de lactato em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de mulheres (n = 4).....	34
Figura 9 - Liberação de lactato em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de todos os indivíduos analisados (n = 11).....	34

Figura 10 -Comparação da liberação de lactato em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral dos homens (n = 7) e das mulheres (n = 4) analisadas.....	35
Figura 11 -Comparação da liberação de lactato estimulada pela noradrenalina e pela noradrenalina juntamente com prazosin (1 μ M) em adipócitos isolados do tecido visceral de mulheres (n = 4).....	37
Figura 12 -Comparação da liberação de lactato estimulada pela noradrenalina e pela noradrenalina juntamente com prazosin (1 μ M) em adipócitos isolados do tecido visceral de homens (n = 5).....	38
Figura 13 -Comparação da liberação de lactato estimulada pela noradrenalina e pela noradrenalina juntamente com prazosin (1 μ M) em adipócitos isolados do tecido visceral dos homens (n = 5) e mulheres (n = 4) analisados.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 O tecido adiposo como órgão endócrino

A capacidade de estocagem e liberação de energia dos seres vivos, principalmente em situações que necessitam seja de um maior estoque, ou de uma maior liberação de energia, se tornou vital para sobrevivência e reprodução das espécies ao longo da evolução. Para garantir que esse mecanismo de armazenamento e utilização das reservas funcione adequadamente, a comunicação entre os sistemas fisiológicos do organismo é de suma importância (KLEIN *et al.*, 2006).

Um dos tecidos que apresenta essa função referente ao controle da estocagem de energia é o tecido adiposo. Até algumas décadas atrás, esta era considerada a sua única função. Entretanto, as evoluções nos procedimentos laboratoriais permitiram estudos cada vez mais aprofundados, de maneira que o tecido adiposo passou a ser considerado um órgão endócrino (GIMENO & KLAMAN, 2005).

Diante destas recentes descobertas, atualmente, inúmeros trabalhos trazem funções atribuídas ao tecido adiposo, que envolvem a participação em processos fisiológicos e patológicos, incluindo os processos inflamatórios e imunes (WARNE, 2003; BAUGUIL, 2005; FANTUZZI, 2005; POND, 2005).

1.2 Os diferentes tipos de tecido adiposo: Branco e Marrom

Nos mamíferos encontramos dois tipos distintos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco ou amarelo e o tecido adiposo pardo ou marrom, sendo que a unidade funcional de ambos é denominada adipócito (CINTI, 2005).

Estas células apresentam diferentes funções e diferente anatomia. O adipócito branco é unilocular, de maneira que é capaz de acumular ácidos graxos após uma refeição. O adipócito marrom é multilocular e apresenta uma grande quantidade de mitocôndrias em seu interior, o que lhe confere a coloração marrom.

O tecido adiposo marrom é encontrado em mamíferos recém nascidos de praticamente todas as espécies, sendo que em animais não hibernantes diminui com o crescimento. Em adultos a quantidade de tecido adiposo marrom é mínima, enquanto que em recém nascidos encontramos depósitos na região cervical posterior, axilar, supra-iliaca, peri-renal, região interscapular, abdominal anterior e retropubiana (HEALTON, 1972; MERKLIN, 1973).

No interior dos adipócitos marrons encontramos a proteína UCP-1, expressa exclusivamente nestas células e, responsável pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa, o que promove a produção de calor neste tipo de célula (SAGGERSON *et al.*, 1988).

Apesar da existência destes dois tipos de tecido adiposo, no caso dos adultos a maior parte do tecido é do tipo branco (GARCIA *et al.*, 2002). Por conta disto, a maioria da literatura encontrada descreve pesquisas com o tecido adiposo branco, que neste trabalho também foi o tecido estudado.

O tecido adiposo branco é regulado tanto por fatores humorais, mas também pelo sistema nervoso. Fibras nervosas provenientes do sistema nervoso simpático realizam a inervação deste órgão, estimulando a lipólise, que é a mobilização dos lipídeos armazenados no tecido adiposo resultando na liberação de glicerol e ácidos graxos livres. Além disto, estudos recentes também mostram que o sistema nervoso parassimpático

também realiza a inervação do tecido adiposo branco em ratos, embora com ação pouco conhecida (FLIERS, 2003).

Outros estudos mostram ainda, a atuação do sistema nervoso autônomo modulando funções no tecido adiposo, tanto nos aspectos celulares, mas também nos mecanismos moleculares (SLAVING & BALLARD, 1978; YOUNGSTROM & BARTNESS, 1995; KREIER, 2002; BARTNESS, 2002). Isto é observado para a lipólise/lipogênese, captação de glicose estimulada pela insulina, na expressão de substâncias pelo adipócito e na regulação do número células adiposas (ROMIJN & FLIERS, 2005).

1.3 Papel dos adrenoreceptores no tecido adiposo

Um dos aspectos estudados no tecido adiposo coletado para realização deste trabalho foi a função lipolítica. Esta função é mediada por agentes lipolíticos que são secretados sempre que há necessidade de substratos energéticos pelo organismo (ROMSOS & LEVEILLE, 1974; GARCIA, 2002).

As catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, são exemplos de agentes lipolíticos atuantes em nosso organismo, e já é de conhecimento da comunidade científica que a ação destas catecolaminas é feita através de adrenoreceptores (JENSEN *et al.*, 1996; CAREY, 1998).

Os adrenoreceptores foram classificados em α e β por Ahlquist (1948) e depois subdivididos nos subtipos 1 e 2 (LANDS *et al.*, 1967a; 1967b). Posteriormente, foi demonstrada a existência de um terceiro subtipo de receptor β , o β_3 , em adipócitos de humanos, ratos e camundongos (KOBILKA *et al.*, 1987; MACHIDA *et al.*, 1990; NAHMIAS *et al.*, 1991).

A distribuição dos subtipos de adrenoreceptores varia de acordo com a espécie, o sexo, a idade do animal, dependendo também da região em que o tecido adiposo está localizado (LAFONTAN & BERLAN, 1995).

O mecanismo de ação dos adrenoreceptores varia para cada subtipo. Todos os subtipos β atuam estimulando a adenilil ciclase, uma enzima que promove a quebra do ATP (adenosina trifosfato) aumentando a concentração de AMPc (adenosina monofosfato cíclico).

A interação entre o receptor e a adenilil ciclase é realizada através de uma proteína G estimulatória (G_s) (GILMAN, 1987). Quando essa proteína é estimulada, ocorre o aumento da síntese intracelular de AMPc, que por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA). A PKA promove a fosforilação da lipase-hormônio-sensível (HSL) e das perilipinas (HOLM *et al.*, 2000; JOHNSON *et al.*, 2000), iniciando o processo de hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (CLIFFORD *et al.*, 2000).

Os receptores α_2 promovem a inibição da adenil ciclase, uma vez que interagem com uma proteína G inibitória (G_i), de maneira que após a ativação α_2 -adrenérgica, ocorre uma diminuição da ativação da PKA (GALITZKY *et al.*, 1993, LANGIN *et al.*, 1996). Embora a maior parte das ações do receptor β_2 esteja relacionada a uma proteína G_s , algumas vezes, estes receptores também podem estar acoplados a uma proteína G inibitória (G_i) (ABRAMSON *et al.*, 1988; XIAO *et al.*, 1995).

A resposta lipolítica é mediada pela participação de quatro subtipos de adrenoreceptores: β_1 , β_2 , β_3 e α_2 (LAFONTAN; DANG-TRAN; BERLAN, 1979; RICHELSEN, 1986; MAURIEGE *et al.*, 1987; WAHRENBERG; LÖNNQVIST; ARNER, 1989), de maneira que os receptores β estimulam a lipólise, enquanto que o receptor α_2 tem

ação contrária atuando no processo de lipogênese. A participação dos receptores α_1 na resposta lipolítica até hoje não é confirmada, entretanto, sabe-se que eles têm participação direta na captação de glicose, e na síntese e secreção de lactato (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1998).

1.4 Produção de lactato pelo tecido adiposo

Uma das vias que fornecem energia para o funcionamento do organismo é denominada glicólise, um processo anaeróbio, que tem como produto final o lactato. Diversos tecidos como os músculos, cérebro e glóbulos vermelhos são responsáveis pela produção de lactato, que em seguida é lançado na corrente sanguínea, e vai para o fígado onde é convertido em glicose, através de uma série de reações que constituem o Ciclo de Cori.

O grupo de DiGirolamo e colaboradores (1989) foi o primeiro a apresentar o tecido adiposo como um importante sítio para a produção de lactato. O lactato é o principal produto da via glicolítica anaeróbica, e também um importante precursor neoglicogênico (DIGIROLAMO *et al.*, 1989).

Vários fatores estão relacionados com a regulação da produção de lactato pelos adipócitos, como por exemplo, o tamanho da célula e a concentração de glicose (DIGIROLAMO *et al.*, 1992). As células adiposas de pequeno tamanho em ratos convertem apenas de 5 a 15% da glicose captada em lactato, enquanto que as células de grande tamanho convertem de 40 a 50% da glicose captada em lactato (CRANDALL *et al.*, 1983; THACKER *et al.*, 1987; NEWBY *et al.*, 1990).

O aumento da concentração de glicose no meio de incubação leva a um aumento da glicose total metabolizada pelos adipócitos em lactato e piruvato (CRANDALL *et al.*, 1983; ATAL *et al.*, 1991). A presença de substâncias como insulina e adrenalina estimulam esta captação de glicose pelos adipócitos e, conseqüentemente, aumentam a conversão da glicose em lactato (DIGIROLAMO *et al.*, 1992).

A relação entre a concentração de lactato e patologias como a obesidade, hiperglicemia, resistência à insulina, vem sendo cada vez mais estudada na tentativa de entender a participação do lactato nestas condições (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996). Por esta razão, analisamos também neste estudo, a quantidade de lactato produzida pelos adipócitos isolados dos indivíduos eutróficos que participaram da pesquisa.

1.5 A produção de adipocinas pelo tecido adiposo

A participação do tecido adiposo nos processos fisiológicos, patológicos, inflamatórios e imunes é realizada tanto através da interação de hormônios, citocinas, enzimas, e outros fatores produzidos pelos diferentes sistemas do organismo, mas também através da produção de diferentes elementos, realizada pelo próprio tecido adiposo.

Estas substâncias produzidas principalmente pelos adipócitos recebem o nome de adipocinas, sendo que diversas substâncias são pertencentes a este grupo, como por exemplo, adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), adiposina, visfatina, leptina, dentre outras (FANTUZZI, 2005).

A participação dessas adipocinas nos processos fisiológicos é feita de diferentes maneiras, uma vez que elas podem ter atuação local ou distante do tecido adiposo, através de mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos (RONTI *et al.*, 2006).

A idéia que os adipócitos são responsáveis pela produção de hormônios não é nova. Kennedy (1953) propôs que um sinal hormonal produzido pelas reservas de energia estocadas sinalizaria no cérebro para controlar a ingestão de alimento e o gasto energético.

Este conceito da produção hormonal pelo tecido adiposo foi se reforçando ao longo das últimas quatro décadas, sendo confirmado com a descoberta do gene que codifica a leptina e seu receptor (FRIEDMAN & HALAAS, 1998).

Até pouco tempo atrás, a leptina era considerada um hormônio produzido exclusivamente pelo tecido adiposo. Entretanto, atualmente, já existem registros da produção desse hormônio, em pequenas concentrações, por tecidos como o estômago, intestino, músculo esquelético, placenta, epitélio mamário e cérebro. A leptina está envolvida em diversos processos do metabolismo energético, neuroendócrino, imune e do sistema cardiovascular (AHIMA, 2005).

Dois novos hormônios que recentemente foram descobertos, e que também são produzidos pelo tecido adiposo, são a apelina e a visfatina. A apelina foi identificada em 1998 por Tatemoto *et al.*, que identificou esse hormônio em células do ovário de hamster (TATEMOTO *et al.*, 1998). Apenas recentemente a apelina foi identificada em adipócitos isolados de ratos e no tecido adiposo subcutâneo de humanos (BOUCHER *et al.*, 2005).

Os estudos envolvendo a apelina ainda são poucos, entretanto, sabe-se que a sua produção está diretamente relacionada com insulina e que indivíduos obesos apresentam uma produção maior deste hormônio que indivíduos eutróficos. Em 25 pacientes obesos mórbidos, a concentração de apelina plasmática encontrada foi cinco vezes maior que nos pacientes eutróficos usados como controle (HEINONEN *et al.*, 2005).

Apesar dos poucos estudos existentes, os pesquisadores acreditam que uma das possíveis funções da apelina está relacionada com a regulação da ingesta alimentar (BELTOWSKI, 2006).

Com relação à visfatina, os estudos são mais recentes ainda. Fukuhara *et al.* (2005), identificou genes que são expressos especificamente no tecido adiposo visceral, e que produziam um fator de crescimento que depois foi chamado de visfatina. Os mesmos autores também observaram que a administração de visfatina reduz a glicose plasmática, mas não exerce efeito nas concentrações de insulina. Estes resultados sugerem que a visfatina promove um efeito hipoglicêmico direto, sem estimular a secreção de insulina (FUKUHARA *et al.*, 2005).

A participação da visfatina em outras funções também já foi descrita, como por exemplo, estimular a diferenciação dos pré-adipócitos para adipócitos maduros, induzir o acúmulo de triglicerídeos, e acelerar a síntese de triglicerídeos a partir da glicose (BELTOWSKI, 2006).

Como citado anteriormente, existem diversas outras substâncias produzidas pelos adipócitos, que também participam de importantes mecanismos fisiológicos e patológicos do organismo, e cada vez mais são estudadas na busca pelo esclarecimento de diversas patologias, como no caso da adiponectina e do TNF- α .

A adiponectina é produzida exclusivamente nos adipócitos e circula em altas concentrações plasmáticas (BERG *et al.*, 2002). Em indivíduos eutróficos as concentrações de adiponectina estão elevadas comparadas a de indivíduos obesos, sendo que esta menor concentração nestes indivíduos é associada com resistência à insulina, dislipidemia,

aterosclerose, e intolerância a glicose (STATNICK *et al.*, 2000; MAEDA *et al.*, 2002; KUBOTA *et al.*, 2002; HALUZIK *et al.*, 2004).

O TNF- α recebeu uma atenção especial na última década, devido sua importância na regulação quantidade de tecido adiposo do organismo. Acreditava-se que este fator era sintetizado e secretado apenas pelo tecido adiposo, tendo uma função parácrina e/ou autócrina no controle de diversas funções dos adipócitos (KERN *et al.*, 1995). Entretanto, pesquisas recentes demonstram que em humanos este fator também é produzido pelas células musculares lisas (RONTI *et al.*, 2006).

Estas alterações na quantidade de tecido adiposo podem estar relacionadas com mudanças no volume ou no número de adipócitos (WARNE, 2003). As alterações no processo de diferenciação dos pré-adipócitos através da adipogênese, apoptose e replicação dos pré-adipócitos são responsáveis por variações na quantidade destas células.

Já os processos de lipólise, lipogênese, e captação de ácidos graxos livres, contribuem para alterar o volume dos adipócitos. Tanto as alterações no número de células quanto no volume celular, são reguladas por diversos fatores, como por exemplo, insulina, glicocorticóides, citocinas e catecolaminas, e sabe-se que o TNF- α tem um importante papel regulatório em vários destes processos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1999).

Os estudos destas adipocinas vêm sendo cada vez mais aprofundados para se compreender a participação do tecido adiposo nos processos fisiopatológicos que podem acometer os indivíduos.

Um exemplo de patologia relacionada com o tecido adiposo e que atualmente é o distúrbio metabólico mais comum no mundo é a obesidade. Segundo dados da organização

mundial de saúde, no mundo inteiro em 2004, existiam mais de um bilhão de adultos com sobrepeso, sendo pelo menos 300 milhões obesos.

A compreensão do funcionamento do tecido adiposo em indivíduos eutróficos, bem como a relação existente entre as diferentes adipocinas produzidas pelos adipócitos, e patologias como a obesidade, proporcionam melhores estratégias na terapia destes distúrbios metabólicos.

Os indivíduos eutróficos são aqueles que apresentam índice de massa corporal (IMC) menor do que 25 (este cálculo está descrito em materiais e métodos). O IMC é um parâmetro utilizado mundialmente para determinar se a massa corporal de um indivíduo está dentro da normalidade, ou se está acima do considerado normal para sua altura e peso.

1.6 Isolamento de adipócitos

A técnica de isolamento de adipócitos foi descrita pela primeira vez por Rodbell (1964), que utilizou como modelo experimental ratos da linhagem Sprague-Dawley. Neste estudo foram verificados os efeitos de hormônios no metabolismo da glicose e na lipólise. Desde então, o advento dessa técnica permitiu que se realizasse um estudo mais detalhado do tecido adiposo, uma vez que se consegue trabalhar com o adipócito isolado.

Ao longo dos anos a técnica original de Rodbell sofreu algumas modificações como o processo de contagem das células adiposas e preparação de uma suspensão celular (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996). Entretanto, até hoje, os trabalhos que envolvem o estudo com adipócitos isolados, não descrevem com detalhes todas as etapas a serem realizadas para proporcionar um trabalho adequado com estas células.

Desta maneira, a técnica de isolamento de adipócitos vem sendo uma ferramenta extremamente importante para estudar a interação de fármacos e medicamentos com o

tecido adiposo, assim como dos mecanismos de funcionamento desse tecido. Diante destas considerações, este estudo se voltou à padronização da técnica de isolamento de adipócitos em indivíduos eutróficos ($IMC < 25$), além de realizar análises funcionais do tecido adiposo retirado no dia da cirurgia gástrica, para ampliarmos o conhecimento do comportamento dessas células quanto à produção de glicerol e lactato frente a estímulos de diferentes agonistas e antagonistas, buscando também uma melhor compreensão dos mecanismos de produção de glicerol e lactato em adipócitos isolados de indivíduos eutróficos, o que é imprescindível para entender condições patofisiológicas como obesidade e diabetes tipo II.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram padronizar e implantar a técnica de isolamento de adipócitos em humanos eutróficos e quantificar a produção de lactato do tecido adiposo visceral destes indivíduos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sujeitos Experimentais

Em nosso trabalho utilizamos voluntários eutróficos. O critério de classificação usado na maioria dos estudos de grande porte tem sido o índice de massa corporal (IMC), que é calculado dividindo-se o peso corporal (em quilogramas) pelo quadrado da altura (em metros), ou dividindo-se o peso (em libras) pelo quadrado da altura (em polegadas) e multiplicando o resultado por 703.

Tabela 1. Classificação de sobrepeso e da obesidade de acordo com base no índice de massa corporal (IMC), onde $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{altura (m)}^2$.

IMC	
Baixo peso	Menor de 18,5
Normal ou eutróficos	18,5 – 24,9
Sobrepeso	25 – 29,9
Obesidade	
Classe I	30 – 34,9
Classe II	35 – 39,9
Classe III (extrema)	Maior de 40

O estudo funcional foi desenvolvido com adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de homens e mulheres, na faixa etária dos 18 aos 75 anos com $IMC < 25$. Esses indivíduos foram submetidos à diferentes tipos de cirurgias gástricas (herniorrafia inguinal,

piloroplastia, colecistectomia, biópsia hepática) realizadas pela equipe do Dr. Henrique Silveira no Hospital Estadual de Sumaré pertencente à Universidade Estadual de Campinas.

Estes sujeitos passaram por uma avaliação médica e exames de sangue de rotina realizados antes da cirurgia conforme o estabelecido pelas normas do hospital. Os indivíduos selecionados passaram por uma anamnese específica que avaliou, entre outros itens, as medidas corporais e a condição necessária para a formação de um grupo homogêneo a ser estudado. O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Campinas, sob o número 097/2003.

3.2 Isolamento de Adipócitos

O tecido adiposo visceral coletado foi colocado em um recipiente estéril contendo solução de KREBS-RINGER-HEPES (KR-HEPES) fria ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), pH 7,4 e levado imediatamente para o laboratório onde se realizou os procedimentos. A quantidade de tampão KR-HEPES utilizada para coletar o tecido adiposo em cada experimento foi de 200 mL. O preparo do tampão KR-HEPES, envolve duas etapas. A primeira delas é a preparação de 200 mL do tampão KREBS-RINGER, que é constituído por 200 mL de NaCl (0,154 M), 8 mL de KCl (0,154 M), 6 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,110 M), 2 mL de KH_2PO_4 (0,154 M), 2 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,154 M). Em seguida, é feito uma mistura deste tampão KR com NaHCO_3 , na proporção de 91% de KR e 9% de NaHCO_3 , portanto, para se fazer 200 mL utilizamos 182 mL de KR e 18 mL de NaHCO_3 . Para completar o tampão é adicionado glicose e hepes. Para o volume de 200 mL, adicionamos 0,476 g de hepes e 0,216 g de glicose, obtendo no tampão, a concentração de 25 mM para o Hapes e 6 mM de glicose.

Para realização da digestão do tecido adiposo e do ensaio funcional com os adipócitos isolados, foi preparado 200 mL de um novo tampão KR-HEPES, porém com adição de 6 g de albumina sérica bovina (BSA, fração V, livre de ácidos graxos). Para cada 100 mL de KR-HEPES adiciona-se 3 g de albumina. Esse novo tampão recebe o nome de KRBA (KREBS-RINGER BICARBONATO ALBUMINA).

A digestão do tecido foi realizada em quatro tubos de polietileno (50 mL) tipo *falcon*, contendo cada um cerca de 3 g de tecido adiposo picado, em um meio contendo 6 mL de KRBA com a adição de 1 mg/mL de colagenase (tipo 2, *Clostridium histoliticum*).

Os tubos foram agitados em 60 ciclos/min. a 37°C durante 45 minutos. A suspensão celular resultante de cada um dos *falcons* foi filtrada através de uma malha de *nylon* para um novo *falcon*. Com o auxílio de uma pipeta de 5 mL, o infranadante foi removido, permanecendo no interior do tubo apenas as células. Em seguida, adicionamos 6 mL do tampão KRBA e esperamos 3 minutos até que a maioria das células adiposas flutuassem. Seguiu-se então uma nova aspiração do infranadante e uma nova lavagem das células. Este procedimento foi repetido três vezes e após a última lavagem o volume do *falcon* foi acertado para 12 mL (RODBELL, 1964 modificado).

3.3 Contagem das Células

Após a preparação dos adipócitos, uma alíquota de 100 µL da suspensão celular final é pipetada em um tubo de ensaio e adiciona-se mais 900 µL de KRBA para obter uma diluição de 1:10. Desta nova suspensão celular são pipetados 10 µL em uma câmara de *Mallassez* (Figura 1), que é levada ao microscópio óptico a fim de constatar a integridade e

realizar a contagem do número de células adiposas presentes no campo demarcado da câmara e, assim, ajustar a concentração de células em 100.000 células/mL conforme Faintrenie & Gélöën (1996), e adaptado para estudos em humanos (GRASSI-KASSISSE, 1998).

Este procedimento de contagem dos adipócitos deve ser realizado por quatro vezes, e em seguida faz-se a média dos valores obtidos. A partir desta média realiza-se a multiplicação deste valor pelo fator de diluição que, conforme descrito anteriormente, foi de 10 vezes.

Para ajustar o valor para 100.000 células/mL, divide-se 100 pelo valor encontrado na etapa anterior. Este novo número deve ser multiplicado por 1000 para transformar mL em μL , de maneira que o valor encontrado corresponde a quantidade de μL que deve ser pipetada do *falcon* para se obter 100.000 células.

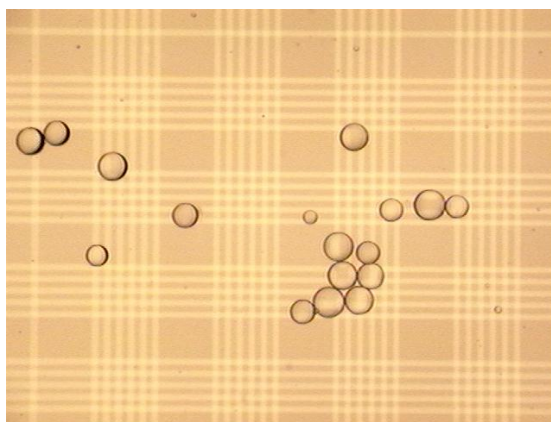


Figura 1. Câmara de *Mallassez* contendo adipócitos isolados para realização da contagem. Imagem obtida de microscópio óptico em aumento de 50 vezes.

3.4 Estudo Farmacológico

Uma vez realizada a contagem, bem como o ajuste do volume para concentração de 100.000 células/mL foi iniciada a incubação dos adipócitos. As células foram incubadas com o agonista não seletivo de adrenoceptor α e β , a noradrenalina nas concentrações de 0,001 μ M a 1 μ M, na ausência ou presença do prazosin, antagonista seletivo para o subtipo α_1 de adrenoceptor, na concentração de 1 μ M (PAUL *et al.*, 1999).

Para determinação do valor basal, os adipócitos foram incubados conforme descrito abaixo, na ausência de agonistas ou antagonistas. Foram preparados também *eppendorfs* contendo suspensão celular e solução tampão, que foram imediatamente colocados em gelo picado. Os valores de glicerol e lactato obtidos a partir destes ensaios foram utilizados para descontar os valores de lipólise e/ou glicólise decorrentes da manipulação destes tubos, que foram denominados “gelo”. Finalmente alguns adipócitos foram incubados com o antagonista prazosin na concentração descrita acima.

Os experimentos foram realizados em triplicatas, sendo o volume final dos *eppendorfs* acertado para 1 mL. A incubação foi realizada em banho-maria a 37°C durante 60 minutos, sob agitação constante de 60 ciclos/minuto. A colocação da suspensão celular no *eppendorf* determinou o início do ensaio.

A reação foi finalizada após esse período colocando-se as amostras em gelo picado. Após a permanência das células no gelo por 40 minutos, os adipócitos foram retirados do meio de incubação através da aspiração e o infranadante foi imediatamente congelado e armazenado a -20°C para posterior análise da concentração de glicerol e lactato com *kit* apropriado.

3.5 Determinação do Glicerol no Meio de Incubação

O índice de lipólise foi avaliado pela quantidade de glicerol produzida no meio de incubação. Este glicerol, presente no meio de incubação foi quantificado através de reações catalisadas pelas enzimas glicerol quinase, glicerol fosfato oxidase e peroxidase (*kit* de triglicerídeos da Laborlab, SP, Brasil).

O glicerol é fosforilado pela adenosina trifosfato (ATP) formando glicerol-1-fosfato e ADP, sendo esta reação catalisada pela glicerol quinase. O glicerol-1-fosfato é então oxidado pela glicerol fosfato oxidase em fosfato de diidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. A coloração é então produzida pela reação catalisada pela peroxidase.

Antes de iniciar o experimento foram feitas curvas com concentração conhecida de glicerol. Foram preparados cinco *ependorfs* contendo a solução padrão de glicerol e tampão KRBA e um *ependorf* contendo apenas tampão KRBA, que chamamos de “zero”. As concentrações conhecidas foram 5 µg/ 200 mL (5 mL da solução padrão + 195 mL de KRBA), 10 µg/ 200 mL (10 mL da solução padrão + 190 mL de KRBA), 20 µg/ 200 mL (20 mL da solução padrão + 180 mL de KRBA) 25 µg/ 200 mL (25 mL da solução padrão + 175 mL de KRBA) e 50 µg/ 200 mL (50 mL da solução padrão + 150 mL de KRBA), que compreendia o valor da liberação de glicerol em adipócitos.

Para análise da quantidade de glicerol liberada foi utilizada uma placa de Elisa, e nos *wells* foram pipetadas alíquotas de 10 µL para cada concentração da curva descrita acima (triplicata de cada concentração), 10 µL de água mili Q em três *wells*, que foi utilizada para zerar o leitor de Elisa, e 10 µL da amostra de cada *ependorf* do ensaio

funcional. Em seguida, foi adicionado 50 µL do reativo de trabalho do *kit* em todos os *wells*, menos nos que continham apenas água.

A placa foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Transcorrido este tempo a reação foi parada adicionando-se 50 mL de água mili Q gelada em todos os *wells* e, imediatamente após a adição da água, foi realizada a leitura da concentração de glicerol através de um leitor de Elisa em comprimento de onda de 540 nm.

A concentração de glicerol no meio de incubação foi expressa em µmol de glicerol em 10⁶ células/60 minutos (FAINTRENIE & GÉLÖEN, 1996)

3.6 Determinação do Lactato no Meio de Incubação

Para a determinação da concentração de lactato presente no meio de incubação dos adipócitos, foi utilizado *kit* enzimático da Trinity.

O ácido láctico é convertido em piruvato e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela lactato oxidase. Na presença do H₂O₂ formado, a peroxidase catalisa a oxidação de um precursor cromogênico que produz a coloração.

Da mesma maneira que o experimento para determinar a quantidade de glicerol liberada pelos adipócitos, inicialmente é preparada uma curva com concentrações conhecidas de lactato. São preparados sete *ependorfs* contendo diferentes quantidades da solução padrão que acompanha o *kit*, e de KRBA.

A partir do ponto 444 µg/µL (50 µL da solução padrão + 450 µL de KRBA) são preparados os outros pontos da curva: 341 µg/µL (100 µL da solução 444 µg/µL + 30 µL de KRBA); 296 µg/µL (100 µL da solução 444 µg/µL + 50 µL de KRBA); 222 µg/µL (75 µL da solução 444 µg/µL + 75 µL de KRBA); 148 µg/µL (100 µL da solução 444 µg/µL +

200 μL de KRBA); 74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (100 μL da solução 148 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 100 μL de KRBA); 37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (75 μL da solução 74 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 75 μL de KRBA). Também é considerado um ponto zero para a curva, que contém apenas KRBA.

Para análise da quantidade de lactato liberada pelos adipócitos utilizamos uma placa de Elisa, e nos *wells* pipetamos alíquotas de 10 μL para cada concentração da curva descrita acima (triplicata de cada concentração), 10 μL de água mili Q em três *wells*, que foi utilizada para zerar o leitor de Elisa, e 10 μL da amostra de cada *eppendorf* do ensaio funcional. Em seguida, foi adicionado 90 μL do reativo de trabalho do *kit* em todos os *wells*, menos nos que continham apenas água.

A placa foi incubada por 10 minutos em banho-maria a 37°C e, para prevenir a degradação do lactato pela ação luminosa, a placa deve ser envolvida em papel alumínio. Após a incubação é feita a leitura da concentração de lactato através de um leitor de Elisa em comprimento de onda de 540 nm.

3.7 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM. Estão apresentados valores gerais e separados por gênero. Quando separados por gênero os mesmos foram analisados através do teste *t* de Student. Também foi analisada a área sob a curva para liberação de glicerol e lactato na presença de noradrenalina e de noradrenalina juntamente com prazosin. Para tais análises foi utilizado o *software* Prisma (Graphpad Software Inc., USA). A diferença foi considerada significativa quando os valores de *p* foram menores que 5%.

4. RESULTADOS

Dentre os indivíduos analisados, 16 eram do sexo masculino e 5 eram do sexo feminino. Conforme descrito anteriormente, todos os indivíduos participantes deste trabalho apresentaram $IMC < 25$, o que os caracterizava como eutróficos. O valor para o IMC dos indivíduos do sexo masculino foi de $21,70 \pm 0,61 \text{ Kg/m}^2$. Já para as mulheres, o valor do IMC foi igual a $22,10 \pm 1,1 \text{ Kg/m}^2$. Não foi encontrada diferença significativa entre estes valores.

A idade dos indivíduos analisados também não apresentou diferença estatística significativa. A idade dos indivíduos do sexo masculino apresentou um valor médio de $46 \pm 4,5$ anos, enquanto que para as mulheres o valor ficou em $49 \pm 6,1$ anos. A tabela 2 mostra os dados para o IMC e idade dos indivíduos analisados.

Tabela 2. Idade (anos) e Índice de Massa Corporal ($IMC = \text{kg/m}^2$) dos indivíduos analisados.

	Indivíduos	
	Homens	Mulheres
	(n= 16)	(n = 5)
Idade (anos)	$46 \pm 4,5$	$49 \pm 6,1$
IMC (kg/m^2)	$21,70 \pm 0,61$	$22,10 \pm 1,1$

Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os gêneros.

Para alguns dos indivíduos analisados, tivemos acesso aos dados laboratoriais para as concentrações de glicose e colesterol. A concentração plasmática de glicose de jejum para os homens foi de $101,40 \pm 12,40$ mg/dL, enquanto que para as mulheres este valor foi de $84,80 \pm 2,10$ mg/dL.

A concentração de colesterol total para os homens (H) foi igual a $197 \pm 6,10$ mg/dL, e de $193 \pm 10,20$ para as mulheres (M). Tanto para a glicose quanto para o colesterol estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Estes dados estão mostrados na tabela 3 e também não diferem dos valores normais para adultos, que no caso da glicose é menor que 115 mg/dL, e para o colesterol o valor normal é abaixo de 200 mg/dL.

Tabela 3. Concentrações plasmáticas de glicose (mg/L) e colesterol total (mg/dL) dos indivíduos analisados.

	Indivíduos	
	Homens	Mulheres
	(n= 13)	(n = 5)
Glicose (mg/dL)	$101,40 \pm 12,40$	$84,80 \pm 2,10$
Colesterol (mg/dL)	$197 \pm 6,10$	$193 \pm 10,20$

Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os gêneros.

Com relação aos dados farmacológicos para a produção de glicerol e lactato, nem todos os indivíduos analisados foram utilizados para a confecção das curvas dose-resposta, uma vez que os resultados obtidos não eram confiáveis, devido a erros metodológicos durante a realização dos ensaios, ou por insuficiência da quantidade de tecido adiposo retirada do paciente, o que não permitiu a realização de todas as etapas do experimento. Neste último caso, foi feita a digestão do tecido e as células foram guardadas para futuras análises de biologia molecular.

A análise dos resultados para liberação de glicerol e lactato foi feita da seguinte maneira: Primeiramente, foi verificada a quantidade liberada destes marcadores metabólicos em cada um dos tratamentos realizados descritos na metodologia, para cada sexo isoladamente. Em seguida, foi feita a comparação entre os sexos e, posteriormente, uma análise comparativa da liberação de glicerol e lactato nas diferentes situações propostas, com a liberação basal de todos os indivíduos estudados sem distinção por sexo.

A liberação de glicerol pelos adipócitos dos *eppendorfs* do tratamento “Gelo” apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre os dois sexos ($H = 0,72 \pm 0,12$ vs. $M = 0,20 \pm 0,07$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Tabela 4). Para a lipólise basal, também foi observado uma diferença significativa entre os sexos ($H = 0,34 \pm 0,06$ vs. $M = 0,16 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Tabela 4).

A Figura 2 representa a liberação de glicerol estimulada pela noradrenalina, para os homens analisados, onde encontramos diferenças significativas comparada a liberação basal de glicerol deste sexo (BGH = Liberação basal de glicerol dos homens) nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 μM (BGH = $0,34 \pm 0,06$ vs. 0,01 μM = $0,61 \pm 0,10$; 0,1 μM = $0,76 \pm 0,14$;

1 μ M = 0,77 $\pm$ 0,16 μ mol/10⁶células.60min, p<0,05). Não foram encontradas diferenças significativas entre as diferentes concentrações de noradrenalina.

Tabela 4. Liberação de basal de glicerol (μ mol/10⁶células.60 min.) e após o tratamento “Gelo” dos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos eutróficos.

	Indivíduos	
	Homens	Mulheres
	(n= 7)	(n = 4)
Basal	0,34 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,01 ⁺
Gelo	0,72 $\pm$ 0,12	0,20 $\pm$ 0,07 ⁺

Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para p < 0,05. ⁺ p < 0,05 Homens vs. Mulheres na mesma condição.

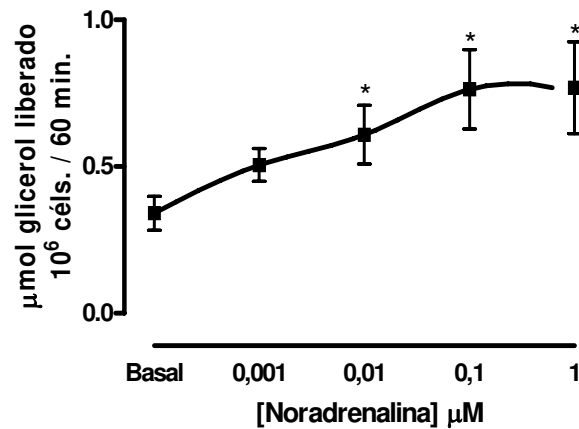


Figura 2. Liberação de glicerol em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de homens ($n = 7$). A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ em relação ao valor basal.

Para as mulheres, a liberação de glicerol estimulada pela noradrenalina comparada à liberação basal deste marcador para o sexo feminino (BGM = Liberação basal de glicerol das mulheres) foi significativamente diferente apenas nas concentrações de 0,01 e 0,1 μM (BGM = $0,16 \pm 0,01$ vs. 0,01 μM = $0,29 \pm 0,01$; 0,1 μM = $0,34 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/10^6 \text{ células.60min}$, $p < 0,05$) (Figura 3). Entre as diferentes concentrações de noradrenalina foram encontradas as seguintes diferenças significativas: 0,001 vs. 0,01 μM ; 0,001 vs. 0,1 μM e 0,01 vs. 0,1 μM .

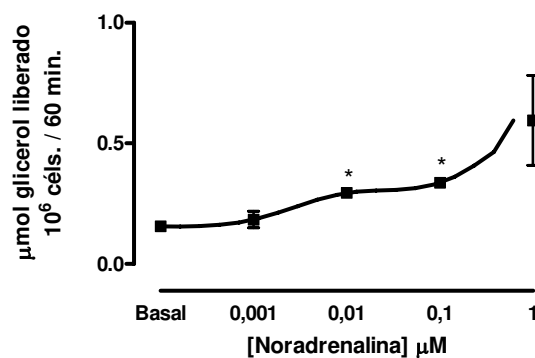


Figura 3. Liberação de glicerol em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de mulheres ($n = 4$). A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ em relação ao valor basal.

Quando juntamos os dados de ambos os sexos desta liberação de glicerol estimulada pela noradrenalina e comparamos ao valor basal de glicerol de todos os indivíduos analisados (BGT = Liberação basal de glicerol de todos os indivíduos), encontramos diferenças significativas para as concentrações de 0,01, 0,1 e 1 μM (BGT = $0,27 \pm 0,05$ vs. 0,01 $\mu\text{M} = 0,49 \pm 0,08$; 0,1 $\mu\text{M} = 0,61 \pm 0,11$; 1 $\mu\text{M} = 0,71 \pm 0,12$ $\mu\text{mol}/10^6 \text{ células.60min}$, $p < 0,05$) (Figura 4). Nesta condição encontramos diferença significativa entre a concentração 0,001 vs. 1 μM .

A comparação entre os sexos para a liberação de glicerol estimulada pela noradrenalina mostrou diferenças significativas para as doses de 0,001, 0,01 e 0,1 μM (Tabela 5 e Figura 5).

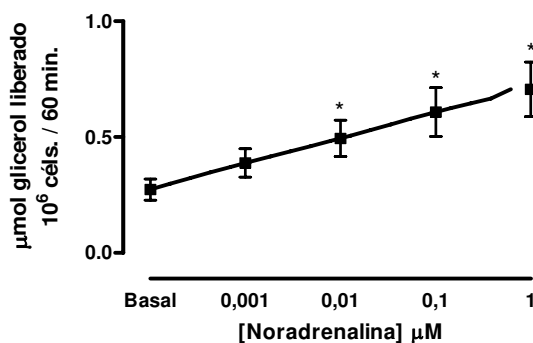


Figura 4. Liberação de glicerol em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de todos os indivíduos analisados ($n = 11$). A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ em relação ao valor basal.

A Tabela 5 também mostra os valores médios $\pm$ EPM para a liberação de glicerol em cada uma das concentrações de noradrenalina utilizadas além dos valores basais para cada sexo e com todos os indivíduos juntos.

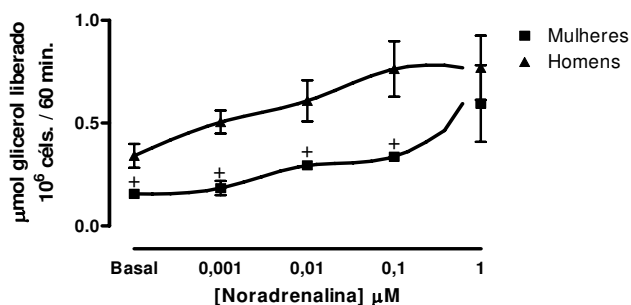


Figura 5. Comparação da liberação de glicerol em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral dos homens ($n = 7$) e das mulheres ($n = 4$) analisados. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. + $p < 0,05$ Homens vs. Mulheres na mesma condição.

Tabela 5. Liberação de glicerol basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6\text{células.60 min.}$) por diferentes concentrações de noradrenalina pelos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos.

	Indivíduos		
	Homens (n = 7)	Mulheres (n = 4)	Todos (n = 11)
Basal	$0,34 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,01^*$	$0,27 \pm 0,05$
[Noradrenalina]			
0,001 μM	$0,51 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,03^+$	$0,39 \pm 0,06$
0,01 μM	$0,61 \pm 0,10^*$	$0,29 \pm 0,01^{*+}$	$0,49 \pm 0,08^*$
0,1 μM	$0,76 \pm 0,14^*$	$0,34 \pm 0,01^{*+}$	$0,61 \pm 0,11^*$
1 μM	$0,77 \pm 0,16^*$	$0,60 \pm 0,19$	$0,71 \pm 0,12^*$

Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ em relação ao valor basal do respectivo grupo; + $p < 0,05$ Homens vs. Mulheres na mesma condição.

Na Tabela 6 temos os valores da liberação de glicerol na presença de noradrenalina juntamente com o prazosin ($1\mu\text{M}$) para os indivíduos do sexo masculino. A liberação de glicerol nesta condição foi significativamente maior comparado ao valor basal deste sexo para as concentrações de 0,1 e 1 μM (BGH = $0,34 \pm 0,06$ vs. 0,1 μM = $1,10 \pm 0,21$ 1 μM = $0,83 \pm 0,17 \mu\text{mol}/10^6\text{células.60 min.}$, $p < 0,05$).

Este tratamento, no caso das mulheres, apresentou liberação de glicerol significativamente diferente do basal para as todas as concentrações utilizadas (BGM =

0,16 $\pm$ 0,01 vs. 0,001 μ M = 0,34 $\pm$ 0,06; 0,01 μ M = 0,36 $\pm$ 0,05; 0,1 μ M = 0,46 $\pm$ 0,11; 1 μ M = 0,67 $\pm$ 0,16 μ mol/10⁶células.60min, p<0,05) (Tabela 6). O mesmo resultado foi observado quando os indivíduos foram analisados juntos (BGT = 0,27 $\pm$ 0,05 vs. 0,001 μ M = 0,52 $\pm$ 0,09; 0,01 μ M = 0,53 $\pm$ 0,10; 0,1 μ M = 0,84 $\pm$ 0,16; 1 μ M = 0,77 $\pm$ 0,12 μ mol/10⁶células.60min, p<0,05) (Tabela 6).

Tabela 6. Liberação de glicerol basal e estimulada (μ mol/10⁶células.60 min.) por diferentes concentrações de noradrenalina na presença de prazosin (1 μ M) pelos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos.

	Indivíduos		
	Homens (n = 6)	Mulheres (n = 4)	Todos (n = 10)
Basal	0,34 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,01*	0,27 $\pm$ 0,05
[Noradrenalina]			
0,001 μM	0,63 $\pm$ 0,14	0,34 $\pm$ 0,06*	0,52 $\pm$ 0,09*
0,01 μM	0,65 $\pm$ 0,15	0,36 $\pm$ 0,05*	0,53 $\pm$ 0,10*
0,1 μM	1,10 $\pm$ 0,21*	0,46 $\pm$ 0,11* ⁺	0,84 $\pm$ 0,16*
1 μM	0,83 $\pm$ 0,17*	0,67 $\pm$ 0,16*	0,77 $\pm$ 0,12*

Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para p < 0,05. * p < 0,05 em relação ao valor basal do respectivo grupo; ⁺ p < 0,05 Homens vs. Mulheres na mesma condição.

Quando comparamos a liberação de glicerol, na condição acima, entre os sexos, encontramos diferenças significativas apenas na concentração 0,1 μM (Figura 6 e Tabela 6).

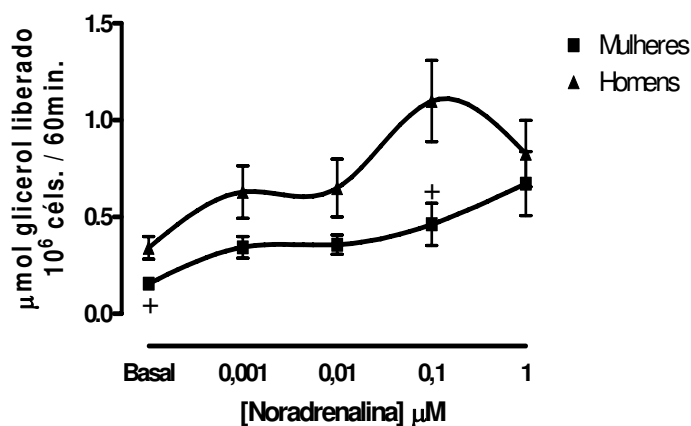


Figura 6. Comparação da liberação de glicerol em resposta à noradrenalina na presença de prazosin (1 μM) de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral dos homens ($n = 6$) e das mulheres ($n = 4$) analisadas. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. ⁺ $p < 0,05$ Homens vs. Mulheres na mesma condição.

Quando analisamos a área sob a curva de noradrenalina na presença ou ausência de prazosin (1 μM) encontramos diferenças significativas entre os sexos em ambas as condições (Tabela 7).

Tabela 7. Área sob a curva para liberação de glicerol ($\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{ min.}$) na presença de diferentes concentrações de noradrenalina (0,001 μM a 1 μM) de homens (n = 7) e de mulheres (n = 4) e de noradrenalina na presença de prazosin (1 μM) de homens (n = 6) e de mulheres (n = 4) .

	Indivíduos	
	Homens	Mulheres
Noradrenalina	$2,43 \pm 0,37$	$1,19 \pm 0,10^+$
Noradrenalina + Prazosin	$2,48 \pm 0,41$	$1,33 \pm 0,26^+$

Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. ⁺ $p < 0,05$ Homens vs. Mulheres na mesma condição.

A produção de lactato pelos adipócitos submetidos ao tratamento “Gelo” não apresentou diferença significativa entre os sexos (H = $0,18 \pm 0,06$ vs. M = $0,17 \pm 0,05$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$) (Tabela 8), assim como a liberação basal de lactato que também não apresentou diferença significativa entre os sexos (H = $0,10 \pm 0,01$ vs. M = $0,12 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$) (Tabela 8).

A liberação de lactato estimulada pela noradrenalina em indivíduos do sexo masculino é mostrada na Figura 7. A produção de lactato foi significativamente maior nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 μM comparado ao valor basal liberado de lactato para este

sexo (BLH = Liberação basal de lactato dos homens) (BLH = $0,10 \pm 0,01$ vs. $0,01 \mu\text{M} = 0,19 \pm 0,03$; $0,1 \mu\text{M} = 0,28 \pm 0,04$; $1 \mu\text{M} = 0,21$ vs. $0,03 \mu\text{mol}/10^6\text{células.60min}$, $p < 0,05$).

Tabela 8. Liberação de basal de lactato ($\mu\text{mol}/10^6\text{células.60 min.}$) e após o tratamento “Gelo” dos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de indivíduos eutróficos.

	Indivíduos	
	Homens	Mulheres
	(n= 9)	(n = 5)
Basal	$0,10 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$
Gelo	$0,18 \pm 0,06$	$0,17 \pm 0,05$

Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student. Não observamos diferenças significativas na análise entre os gêneros.

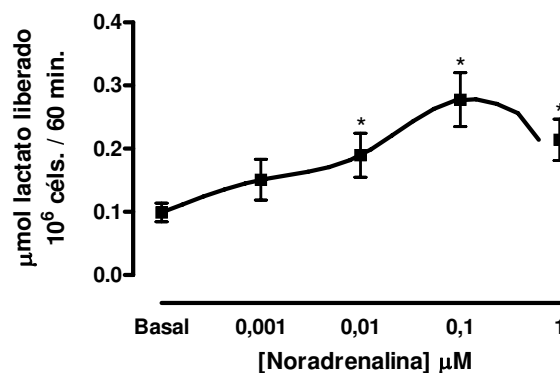


Figura 7. Liberação de lactato em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de homens ($n = 7$). A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ em relação ao valor basal.

Esta mesma condição, no caso das mulheres, mostrou uma diferença significativa na liberação de lactato comparado ao valor basal de lactato deste sexo (BLM = Liberação basal de lactato das mulheres) para as concentrações de 0,01 e 0,1 μM (BLM = $0,12 \pm 0,02$ vs. 0,01 $\mu\text{M} = 0,24 \pm 0,04$; 0,1 $\mu\text{M} = 0,31 \pm 0,03 \mu\text{mol}/10^6 \text{ células.60min}$, $p < 0,05$) (Figura 8). Tanto para os homens quanto para as mulheres analisadas, encontramos diferenças significativas entre as concentrações de noradrenalina apenas na comparação 0,001 vs. 0,1 μM .

Na análise dos resultados para a liberação de lactato estimulada pela noradrenalina, comparada à liberação basal de lactato de todos os indivíduos analisados (BLT = Liberação basal de lactato de todos os indivíduos) foi encontrado diferenças significativas para todas as concentrações utilizadas (BLT = $0,10 \pm 0,01$ vs. 0,001 $\mu\text{M} = 0,16 \pm 0,02$; 0,01 $\mu\text{M} = 0,21 \pm 0,03$; 0,1 $\mu\text{M} = 0,29 \pm 0,03$; 1 $\mu\text{M} = 0,24 \pm 0,04 \mu\text{mol}/10^6 \text{ células.60min}$, $p < 0,05$)

(Figura 9). Entre as concentrações de noradrenalina encontramos diferença significativa apenas na concentração 0,001 vs. 0,1 μM .

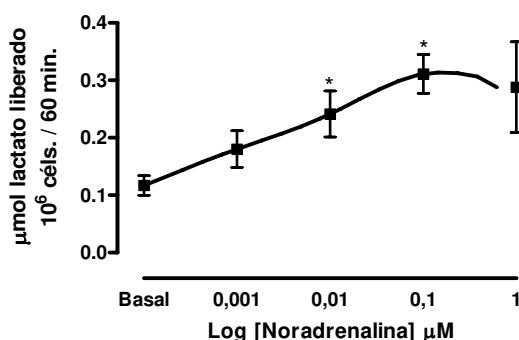


Figura 8. Liberação de lactato em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de mulheres ($n = 4$). A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ em relação ao valor basal.

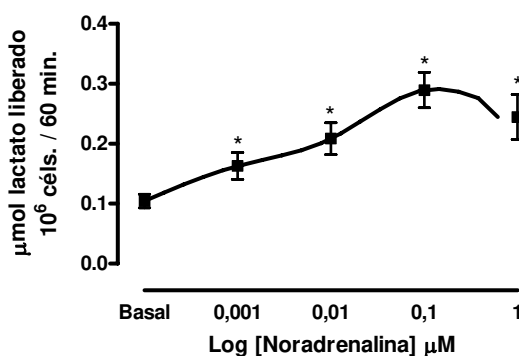


Figura 9. Liberação de lactato em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de todos os indivíduos analisados ($n = 11$). A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ em relação ao valor basal.

Quando realizamos a comparação entre homens e mulheres para a liberação de lactato estimulada pela noradrenalina, não encontramos diferenças significativas em nenhuma das concentrações (Figura 10).

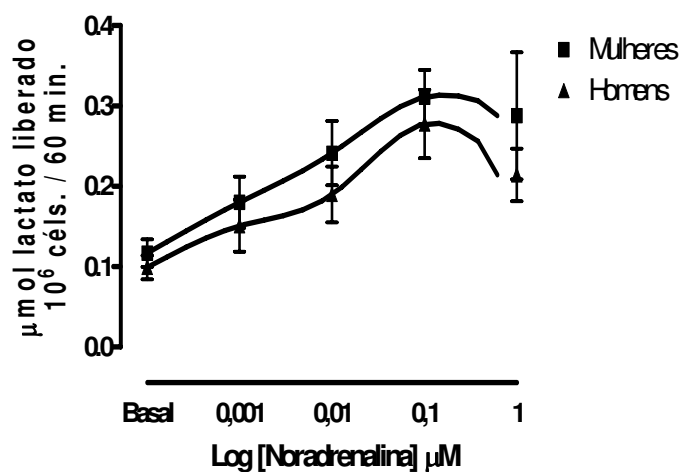


Figura 10. Comparação da liberação de lactato em resposta à noradrenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral dos homens ($n = 7$) e das mulheres ($n = 4$) analisadas. A significância da quantidade de lactato produzida em relação ao valor basal de cada grupo está representada nas figuras 9 e 10 e na tabela 8. Não houve diferença significativa quando os dados foram analisados entre gêneros (teste t de Student).

A tabela 9 ilustra as quantidades de lactato liberadas pelos adipócitos estimulados por diferentes concentrações de noradrenalina para os indivíduos do sexo masculino e feminino, e ambos os sexos juntos.

Tabela 9. Liberação de lactato basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6\text{células.60 min.}$) por diferentes concentrações de noradrenalina pelos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos.

	Indivíduos		
	Homens (n = 7)	Mulheres (n = 4)	Todos (n = 11)
Basal	$0,10 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01$
[Noradrenalina]			
0,001 μM	$0,15 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,02^*$
0,01 μM	$0,19 \pm 0,03^*$	$0,24 \pm 0,04^*$	$0,21 \pm 0,03^*$
0,1 μM	$0,28 \pm 0,04^*$	$0,31 \pm 0,03^*$	$0,29 \pm 0,03^*$
1 μM	$0,21 \pm 0,03^*$	$0,29 \pm 0,08$	$0,24 \pm 0,04^*$

Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ em relação ao valor basal do respectivo grupo.

Quando foi realizado a incubação de noradrenalina juntamente com prazosin (1 μM) tivemos uma liberação de lactato significativa nas doses de 0,01, 0,1 e 1 μM para os homens comparado ao seu valor basal (BLH = $0,10 \pm 0,01$ vs. 0,01 μM = $0,24 \pm 0,03$; 0,1 μM = $0,23 \pm 0,04$; 1 μM = $0,21 \pm 0,06$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células.60min}$, $p < 0,05$). Para as mulheres, esta mesma condição, só apresentou diferenças significativas para as concentrações de 0,01 e 1 μM (BLM = $0,12 \pm 0,02$ vs. 0,01 μM = $0,23 \pm 0,03$; 1 μM = $0,28 \pm 0,05$) (Tabela 10).

Considerando a condição descrita acima e todos os indivíduos juntos, tivemos uma liberação significativa de lactato para todas as concentrações de noradrenalina comparado ao basal do grupo ($BLT = 0,10 \pm 0,01$ vs. $0,001 \mu M = 0,19 \pm 0,04$; $0,01 \mu M = 0,24 \pm 0,02$; $0,1 \mu M = 0,22 \pm 0,03$; $1 \mu M = 0,24 \pm 0,04 \mu mol/10^6 \text{ células}.60min$, $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre as curvas de noradrenalina juntamente com o prazosin ($1 \mu M$) entre homens e mulheres (Tabela 10).

A incubação de noradrenalina com prazosin ($1 \mu M$) apresentou diferença significativa comparada à curva de noradrenalina isolada apenas na dose de $0,1 \mu M$ para mulheres (Figura 11). Para os homens (Figura 12) e considerando todos os indivíduos juntos (Figura 13) não tivemos inibição da liberação de lactato em nenhuma concentração.

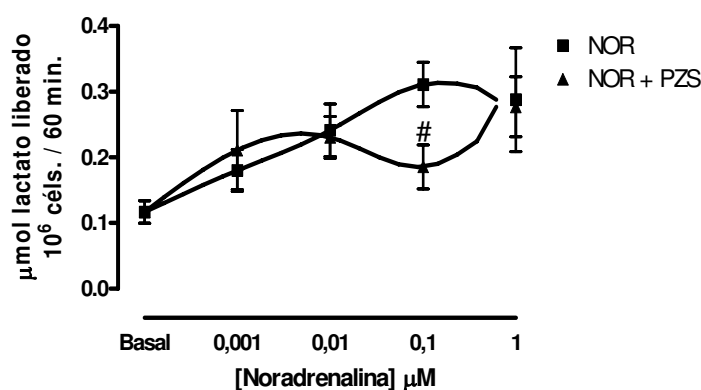


Figura 11. Comparação da liberação de lactato estimulada pela noradrenalina e pela noradrenalina juntamente com prazosin ($1 \mu M$) em adipócitos isolados do tecido visceral de mulheres ($n = 4$). A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. # $p < 0,05$ em relação à mesma dose de noradrenalina sem o prazosin.

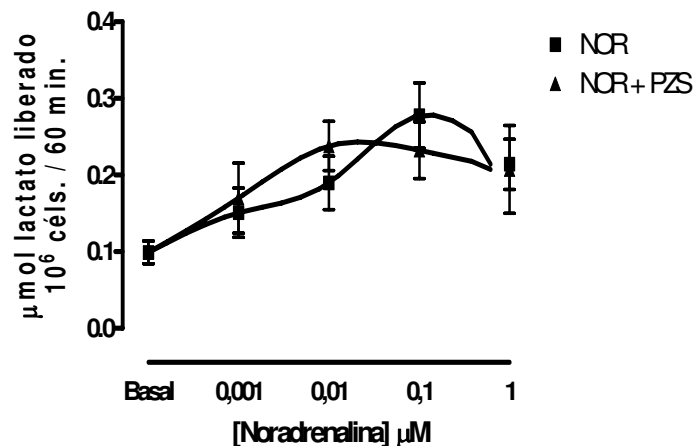


Figura 12. Comparação da liberação de lactato estimulada pela noradrenalina e pela noradrenalina juntamente com prazosin ($1 \mu\text{M}$) em adipócitos isolados do tecido visceral de homens ($n = 5$). A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student. Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas condições.

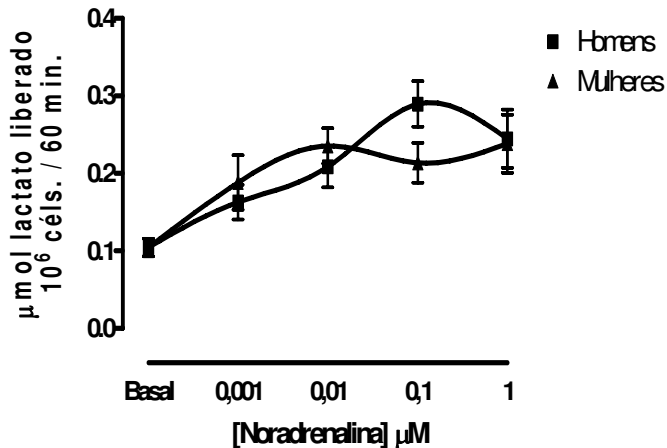


Figura 13. Comparação da liberação de lactato estimulada pela noradrenalina juntamente com prazosin ($1 \mu\text{M}$) em adipócitos isolados do tecido visceral dos homens ($n = 5$) e mulheres ($n = 4$) analisados. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste t de Student. Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas condições.

Tabela 10. Liberação de lactato basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6\text{células.60 min.}$) por diferentes concentrações de noradrenalina na presença de prazosin ($1\ \mu\text{M}$) pelos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos.

	Indivíduos		
	Homens (n = 5)	Mulheres (n = 4)	Todos (n = 9)
Basal	$0,10 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01$
[Noradrenalina]			
0,001 μM	$0,17 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,04^*$
0,01 μM	$0,24 \pm 0,03^*$	$0,23 \pm 0,03^*$	$0,24 \pm 0,02^*$
0,1 μM	$0,23 \pm 0,04^*$	$0,19 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,03^*$
1 μM	$0,21 \pm 0,06^*$	$0,28 \pm 0,05^*$	$0,24 \pm 0,04^*$

Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ em relação ao valor basal do grupo.

Também analisamos a área sob a curva dos indivíduos estudados encontrando diferenças significativas entre os sexos apenas na incubação dos adipócitos com as diferentes concentrações de noradrenalina (Tabela 11).

Tabela 11. Área sob a curva para liberação de lactato ($\mu\text{mol}/10^6\text{células.60 min.}$) na presença de diferentes concentrações de noradrenalina (0,001 μM a 1 μM) de homens (n = 7) e de mulheres (n = 4) e de noradrenalina na presença de prazosin (1 μM) de homens (n = 5) e de mulheres (n = 4).

	Indivíduos	
	Homens	Mulheres
Noradrenalina	0,74 $\pm$ 0,10	0,89 $\pm$ 0,09 ⁺
Noradrenalina + Prazosin	0,59 $\pm$ 0,12	0,68 $\pm$ 0,10

Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. ⁺ $p < 0,05$ Homens vs. Mulheres na mesma condição.

5. DISCUSSÃO

Dentre os objetivos deste trabalho, a padronização da técnica de isolamento de adipócitos em indivíduos eutróficos, pode ser considerada nosso foco principal. Conforme descrito anteriormente, as pesquisas que realizam estudos com os adipócitos isolados não proporcionam uma descrição detalhada da metodologia utilizada para se trabalhar com esta célula isolada.

Por conta disto, procuramos descrever com cuidado todas as etapas, desde a chegada do tecido em nosso laboratório, bem como, as etapas que se sucedem ao longo de todo o processo de isolamento.

Para garantir que a técnica estava sendo realizada da maneira correta e que podíamos confiar nos resultados obtidos, trabalhamos com dois marcadores metabólicos produzidos pelo tecido adiposo que são: o glicerol e o lactato. A literatura envolvendo a produção de lactato em adipócitos isolados ainda é muito escassa, e quando se trata de adipócitos isolados de humanos, praticamente não são encontradas referências sobre esta temática.

Diante disto, o estudo da liberação de glicerol pelos adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de humanos eutróficos teve como objetivo validar o método de isolamento destas células, uma vez que trabalhos envolvendo a produção de glicerol em adipócitos isolados de humanos já existem na literatura e, portanto, seria um excelente parâmetro de comparação.

A produção de glicerol pelos adipócitos é dependente de inúmeros fatores, como por exemplo, idade (KOTANI *et al.*, 1994), sexo (BJORNTORP, 1985; LEY *et al.*, 1992), região do tecido adiposo (LAFONTAN & BERLAN, 2003).

As diferenças existentes na produção de glicerol pelos adipócitos isolados de homens e mulheres foram analisadas neste trabalho, sendo que encontramos uma produção maior nos indivíduos do sexo masculino quando comparado às mulheres, tanto na produção basal de glicerol, como nas situações em que tínhamos a presença de noradrenalina em diferentes concentrações. Nossos dados estão de acordo com relatos anteriores da literatura que demonstram lipólise aumentada em indivíduos do sexo masculino. Rebuffé-Scrive *et al.* (1989) comparou a liberação basal e estimulada pela noradrenalina no tecido adiposo visceral e no tecido adiposo subcutâneo de homens e mulheres. Foi demonstrado neste estudo, que a taxa de lipólise estimulada no tecido adiposo visceral de homens era 1,5 vezes maior na presença de noradrenalina comparada à mesma concentração em mulheres.

Em nosso trabalho a noradrenalina também proporcionou um estímulo maior à liberação de glicerol dos adipócitos isolados de homem comparado às mulheres analisadas. A intensidade desse estímulo variou entre as concentrações utilizadas de noradrenalina, sendo que a quantidade de vezes a mais na concentração de $1\mu\text{M}$ foi a mais baixa (1,2 vezes), enquanto que para a concentração de $0,001\mu\text{M}$ tivemos a maior diferença nessa estimulação (2,7 vezes).

Estes dados suportam a idéia, já descrita na literatura, de que em adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de homens temos uma atividade β -adrenérgica aumentada e uma menor atividade α_2 -adrenérgica quando comparamos com esta atividade no tecido adiposo visceral de mulheres (WILLIAMS, 2004).

O mesmo efeito foi descrito por Jensen (1995), que demonstrou que as mulheres apresentam uma tendência menor a promover a lipólise no tecido adiposo visceral,

comparado a indivíduos do sexo masculino, devido à densidade de receptores α_2 que tem atividade anti-lipolítica.

Como descrito anteriormente, a mobilização dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol é dependente da ativação dos adrenoceptores β_1 , β_2 , β_3 e α_2 (LAFONTAN *et al.*, 1979; RICHELSEN, 1986; MAURIEGE *et al.*, 1987; WAHRENBERG *et al.*, 1989), sendo que os adrenoceptores β têm ação principal através de uma proteína G_s , que estimula a lipólise, enquanto que a ação α_2 tem efeito exatamente oposto por atuar através de uma proteína G_i que é responsável pela lipogênese, processo contrário a lipólise.

O agonista utilizado em nossos estudos, a noradrenalina, apresenta ação em ambos os receptores. A lipólise produzida por esta catecolamina é resultante da proporção de receptores β e dos receptores α_2 ativados. Quando temos um aumento da lipólise estimulada pela noradrenalina em relação à lipólise basal, podemos concluir que a proporção de receptores β ativados é maior que a população dos receptores α_2 que estão sendo ativados (BERLAN & LAFONTAN, 1985; MAURIÈGE *et al.*, 1987).

A distribuição dos adrenoceptores nos tecidos é variável de acordo com o sexo, espécie e regiões do tecido adiposo. A sensibilidade lipolítica no tecido adiposo de homens foi maior no depósito adiposo visceral comparado aos depósitos femorais de gordura (REBUFFÉ-SCRIVE *et al.*, 1987). A causa disto seria uma população aumentada de adrenoceptores β no tecido adiposo visceral dos homens.

Segundo Richelsen (1986), a população de adrenoceptores α_2 no tecido adiposo da região glútea em mulheres é maior comparada à população destes mesmos subtipos, no mesmo tecido, de homens. Estas informações também ajudam a sugerir que a lipólise em indivíduos do sexo masculino é maior que a lipólise em mulheres.

Outro ponto importante a ser considerado, é o fato de que em mulheres a concentração de lipoproteína lipase é maior que em homens (PRICE *et al.*, 1998). Esta enzima apresenta importante função na hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos que serão captados pelos adipócitos e formarão novos triacilgliceróis, que então são armazenados. Como esta enzima proporciona uma estocagem maior de triacilgliceróis, é possível que este fator também seja responsável por diminuir a mobilização de gordura em mulheres, o que favorece a ação das catecolaminas induzindo a lipólise em maior quantidade nos indivíduos do sexo masculino.

Este mesmo efeito pode explicar o fato da lipólise basal, sem presença de nenhum agonista, ser maior em homens do que em mulheres. Outro fator que pode estar influenciando a lipólise basal é a concentração de adenosina.

A adenosina é uma substância que aparentemente é produzida por todos os tecidos do organismo (VERNON *et al.*, 1990). Dentre seus efeitos encontramos ação sobre o sistema cardiovascular, sendo um potente vasodilatador (BERNE *et al.*, 1983), além de apresentar efeitos metabólicos modulando a ação da adenilato ciclase (FAIN & MALBON, 1979).

Efeitos da adenosina no tecido adiposo foram demonstrados a mais de 40 anos por Dole (1961), que mostrou que esta substância apresentava um importante efeito antilipolítico. Outro trabalho descreveu que a adenosina acumulada no meio de incubação de adipócitos isolados, quando em concentrações adequadas, pode modificar a ação de outras substâncias como as catecolaminas (SCHWABE *et al.*, 1975).

O mecanismo de ação da adenosina é promover a inibição do acúmulo de AMPc (OHISALO *et al.*, 1984) e conseqüentemente inibir a lipólise. A medida da concentração de adenosina nos tecidos é difícil de ser determinada já que as concentrações de AMP, ADP,

NAD e NADP presentes são maiores que a concentração de adenosina e interferem na medição (RANTA *et al.*, 1985). Entretanto, este mesmo grupo conseguiu determinar que a concentração de adenosina no tecido adiposo de humano é de aproximadamente 0,56 nmol/g.

A adenosina endogenamente liberada se liga a receptores A1 localizados na membrana plasmática dos adipócitos e inibem diretamente a adenilato ciclase, com conseqüente redução na lipólise (HONNOR *et al.*, 1985a; 1985b). A lipólise basal é preferencialmente inibida pela adenosina. Se esta inibição é decorrente de aumento na produção local de adenosina ou se há aumento na expressão de receptores A1 no tecido adiposo visceral de mulheres, é um fato a ser investigado.

Nossos resultados mostraram também, diferenças existentes entre os gêneros nos adipócitos submetidos ao tratamento “Gelo”, havendo uma liberação maior de glicerol nos adipócitos isolados de homens, comparada à liberação de glicerol dos adipócitos das mulheres analisadas. O tratamento gelo tem por objetivo verificar a quantidade de glicerol produzida devido à manipulação dos adipócitos durante as etapas que precedem a incubação dos mesmos.

Watson e Morris (1987) descreveram que lesões na estrutura celular após a redução repentina na temperatura devido à perda de permeabilidade seletiva da membrana resultando na liberação de componentes celulares como lipídeos, proteínas e íons. Isto pode ser o resultado desta liberação de glicerol excessiva dos adipócitos submetidos a este tratamento “Gelo” tanto em mulheres quanto em homens.

Quando realizamos a incubação dos adipócitos com noradrenalina, na presença de prazosin (1 μ M) também tivemos um aumento da lipólise comparada aos valores basais. O

prazosin é um antagonista α_1 , e até hoje não se sabe qual a participação deste adrenoceptor no processo de lipólise. Portanto, era esperado que a liberação de glicerol nesta condição, fosse maior que a liberação basal, mas que não fosse muito diferente da liberação de glicerol pela noradrenalina sozinha.

A co-incubação prazosin e noradrenalina no meio de incubação induziu um lipólise significativamente maior quando comparada a noradrenalina sozinha. Segundo Bylund (1992), o prazosin também apresenta uma ação antagônica no adrenoceptor α_{2a} . Este subtipo de adrenoceptor α_2 foi descrito em adipócitos de humanos (LAFONTAN & BERLAN, 1995) e pode explicar esta lipólise aumentada na presença de noradrenalina combinada com o prazosin comparada a lipólise resultante da incubação apenas com noradrenalina.

A comparação das curvas de noradrenalina na presença de prazosin ($1\mu\text{M}$) entre homens e mulheres mostrou uma resposta semelhante ao da curva de noradrenalina sem o antagonista, com uma liberação de glicerol menor nos adipócitos isolados das mulheres em todas as concentrações da noradrenalina, mas com diferença estatística significativa apenas na concentração de $0,1\mu\text{M}$. A razão para esta liberação menor em adipócitos isolados de mulheres, provavelmente está relacionada uma atividade β -adrenérgica maior em indivíduos do sexo masculino.

Além da comparação da lipólise estimulada pela noradrenalina na presença ou ausência do prazosin entre os sexos, também analisamos a área sob a curva dos indivíduos estudados para estas duas condições.

Em ambos os tratamentos verificamos uma área sob a curva maior nos indivíduos do sexo masculino comparada a área das mulheres. Isso demonstra uma maior exposição

dos adrenoreceptores nestes indivíduos, o que também seria responsável por esta lipólise aumentada.

Quando juntamos todos os indivíduos analisados na pesquisa, os resultados obtidos conferem com os dados encontrados na literatura, mostrando que na presença de catecolaminas observa-se um aumento da lipólise basal, o que já foi demonstrado em ratos (GRASSI-KASSISSE *et al.*, 2003), camundongos (ROBIDOUX *et al.*, 2006) e em humanos (MAURIÈGE *et al.*, 1995; HELLSTROM *et al.*, 1996; JENSEN *et al.*, 1996; DIVERTIE *et al.*, 1997). Em alguns pontos da curva de noradrenalina nesta condição e quando as mulheres foram analisadas isoladamente, encontramos diferenças significativas entre as concentrações utilizadas, mostrando um comportamento dose-resposta da curva de noradrenalina para estes adipócitos. Apesar de não encontrarmos esta diferença nos homens estudados, acreditamos que este comportamento também ocorra nestes adipócitos, mas devido ao valor do erro padrão da média em alguns pontos isto não foi observado.

O outro objetivo de nosso trabalho foi quantificar a produção de lactato pelos adipócitos isolados de indivíduos eutróficos. Esta função dos adipócitos ainda é relativamente recente, e em virtude disto as pesquisas que demonstram a produção deste marcador metabólico em adipócitos ainda são poucas. Os trabalhos que mostram a produção de lactato pelo tecido adiposo de humanos são realizados com uma metodologia diferente da descrita em nosso estudo. A produção de lactato descrita nestas pesquisas utiliza a técnica de microdiálise que através da perfusão do tecido adiposo subcutâneo, quantifica o lactato (HENRY *et al.*, 1996; SANDQVIST *et al.*, 2001). Entretanto, a quantificação de lactato pelos adipócitos isolados do tecido adiposo de humanos ainda não foi descrita na literatura.

O lactato produzido pelos adipócitos é proveniente da captação da glicose pelas células adiposas que convertem aproximadamente 5-10% desta glicose captada em lactato, no caso de adipócitos pequenos (DIGIROLAMO *et al.*, 1992; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996), mas que também pode alcançar valores maiores como, 35-40% da glicose captada, em adipócitos de maior tamanho (CRANDALL *et al.*, 1983).

Em condições patológicas estes valores podem aumentar ainda mais, como foi observado em animais obesos e diabéticos, que convertiam de 50 a 70% da glicose captada em lactato (NEWBY *et al.*, 1989).

Experimentos *in vivo* com a colocação de cânulas em veias superficiais do abdome ou utilizando técnicas de microdiálise, confirmaram participação significativa da produção de lactato pelo tecido adiposo de todo o organismo (FRAYN *et al.*, 1993; JANSSON *et al.*, 1994).

Até o presente momento, os estudos que relatam esta produção de lactato pelo tecido adiposo, conferem aos adrenoreceptores α_1 o papel de único responsável pela captação da glicose que posteriormente é convertida em lactato.

É conhecido na literatura que a ativação dos adrenoreceptores α_1 promove a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5 – bifosfato, numa reação catalisada pela enzima fosfolipase C, juntamente com a proteína $G_{q/11}$, uma proteína da família das proteínas G, transformando-o em inositol - 1,4,5 – fosfato. Este composto promove a liberação do cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático e do diacilglicerol. O cálcio e o diacilglicerol ativam a proteína quinase C (ZHONG & MINEMAN, 1999).

Os lipídeos presentes na via do fosfatidilinositol 4,5 – bifosfato também servem como substrato para o fosfatidilinositol – 3 – quinase que foi determinada como fundamental para promover o transporte de glicose (KELLY *et al.*, 1992).

A incubação dos adipócitos com a noradrenalina, que foi realizada neste estudo, teve por objetivo determinar a quantidade de lactato produzida por estas células. Tanto nos indivíduos do sexo masculino quanto nos indivíduos do sexo feminino, tivemos uma produção lactato aumentada quando estimulamos com a noradrenalina comparada aos valores basais de cada sexo.

A produção basal de lactato, e a estimulada pelas catecolaminas, já foi observada em ratos Sprague-Dawley. De acordo com o estudo de Faintrenie & Gélöen (1996), a produção basal de lactato (média $\pm$ EPM) nos animais utilizados no estudo foi de $0,07 \pm 0,02 \mu\text{mol}/10^6\text{células}.15\text{min}$.

Nossos resultados também mostraram que a produção basal de lactato é bem inferior à quantidade de glicerol que é produzida. Nas mulheres estudadas a produção de lactato basal foi de $0,12 \pm 0,02 \mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, enquanto que em homens este valor foi de $0,10 \pm 0,01 \mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$.

Se compararmos os dois resultados observamos que a produção de lactato em ratos está expressa no tempo de 15 minutos, enquanto que no caso dos adipócitos de humanos o tempo é de 60 minutos. Quando ajustamos o valor desta liberação de lactato para 60 minutos nos ratos, chegamos a um valor de $0,28 \pm 0,08 \mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$. Este valor indica uma liberação mais acentuada de lactato em ratos do que em humanos.

Outros estudos realizados em nosso laboratório indicaram que a produção de lactato estimulada pela noradrenalina em ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) apresenta

uma resposta máxima de liberação na concentração de $0,01\mu\text{M}$. Hatore (2006) verificou uma produção de lactato de $0,29 \pm 0,03 \mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min.}$ em adipócitos isolados de ratos. No trabalho de Almeida (2006) foi verificada uma produção de lactato de $0,17 \pm 0,03$ também em adipócitos isolados de ratos para a mesma concentração de noradrenalina. No caso dos adipócitos de humanos eutróficos, a liberação máxima foi observada na dose de $0,1\mu\text{M}$, tanto para os homens quanto para as mulheres.

Estes dados podem ser indicativos de uma maior densidade de adrenoreceptores α_1 em ratos do que em humanos, e pode ser o motivo da maior quantidade de lactato produzida nos animais. Existem poucos estudos relacionados com os subtipos de adrenoreceptores α_1 em adipócitos isolados, mas que ajudam a sustentar esta hipótese. Cotecchia *et al.* (1988) foi o responsável por clonar o primeiro adrenoreceptor α_{1B} , que depois foi constatado como sendo o subtipo predominante de adrenoreceptor em adipócitos isolados de ratos (TORRES-MARQUES *et al.*, 1992). Este subtipo apresenta uma densidade maior nestes adipócitos comparado aos adipócitos de humanos (COTECCHIA *et al.*, 1988).

Apesar de não encontrarmos diferença estatisticamente significativa quando a produção de lactato estimulada pela noradrenalina foi analisada entre os gêneros, a quantidade de lactato produzida pelos adipócitos isolados de mulheres foi maior comparada a dos homens. Na análise da área sob a curva para liberação do lactato estimulada pela noradrenalina, observamos um comportamento oposto ao do glicerol com uma área maior para as mulheres comparada à área sob a curva dos homens estudados. Este dado pode ser indicativo de uma possível produção maior de lactato pelo tecido adiposo de indivíduos do sexo feminino, entretanto, ainda é necessário um número maior de experimentos, bem

como a utilização de outros agonistas para confirmar esta hipótese. Outra importante ferramenta que auxiliaria a compreensão destes dados seria a quantificação dos adrenoreceptores α_1 do tecido adiposo visceral de humanos, o que ainda não é encontrado na literatura.

Quando colocamos todos os indivíduos analisados juntos tivemos um resultado semelhante aos resultados descritos para a produção basal de lactato pelos adipócitos isolados de ratos (FANTRENIE & GÉLÖEN, 1996) com estímulo significativamente maior em todas as concentrações utilizadas de noradrenalina.

Na presença de noradrenalina tanto para todos os indivíduos juntos, mas também quando foram separados por sexo, verificamos diferenças entre as concentrações de noradrenalina utilizadas, da mesma maneira como ocorreu para o glicerol o que também sugere um comportamento dose-resposta para este marcador metabólico.

Como para ratos está descrito que são os adrenoreceptores α_1 que estão envolvidos na produção de lactato, verificamos a influência deste subtipo de adrenoreceptor na produção de lactato, combinando a incubação dos adipócitos com noradrenalina juntamente com o prazosin ($1\mu\text{M}$).

Como descrito anteriormente, o prazosin apresenta a função de antagonista α_1 (PAUL *et al.*, 1999), além da função de antagonista α_{2a} (BYLUND, 1992). Era esperado que esta combinação promovesse uma liberação de lactato menor do que aquela proporcionada pela incubação apenas com noradrenalina. Entretanto, nossos resultados mostraram que o prazosin foi eficaz em induzir uma inibição significativa da liberação de lactato apenas na concentração de $0,1\mu\text{M}$ e em ensaios onde os adipócitos foram isolados do tecido adiposo de mulheres. Para os indivíduos do sexo masculino, e mesmo quando

juntamos todos os participantes da pesquisa, o prazosin não alterou a quantidade de lactato induzida pela noradrenalina.

Estudos recentes em nosso laboratório verificaram o mesmo efeito quando os adipócitos isolados de ratos Wistar e de indivíduos obesos foram incubados com o prazosin (1 μ M) (ALMEIDA, 2006; FRANCESCONI *et al.*, 2006).

Estes resultados têm direcionado as pesquisas de nosso laboratório para outros adrenoceptores que possam estar influenciando a produção de lactato, além dos adrenoceptores α_1 . A incubação dos adipócitos isolados de rato com a cirazolina, um agonista α_1 , isoladamente, e juntamente com a isoprenalina, um agonista β , mostrou que a captação de glicose foi maior nos adipócitos que foram incubados em conjunto com os dois agonistas comparado aos adipócitos incubados apenas com a cirazolina. Como a quantidade de glicose captada está diretamente relacionada com a quantidade de lactato produzida, estes dados podem explicar porque a presença de prazosin não foi suficiente para inibir a ação da noradrenalina que também atua via adrenoceptores β .

Estes experimentos são extremamente recentes e foram realizados apenas com os adipócitos isolados de ratos. Com esta técnica de isolamento de adipócitos do tecido adiposo humano implantada em nosso laboratório será possível investigar melhor como os diferentes subtipos de adrenoceptores estão envolvidos na produção de lactato pelos adipócitos de humanos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que a técnica de isolamento de adipócitos em indivíduos eutróficos foi implantada com sucesso, haja vista a reprodução fidedigna de resultados clássicos e amplamente reportados na literatura científica. Concluimos também que os adipócitos isolados de tecido adiposo humano são produtores de lactato e que a noradrenalina estimula esta produção sendo afetada parcialmente pelo bloqueio dos adrenoceptores α_1 quando analisada a área sob a curva. Além disto, em indivíduos eutróficos a produção de lactato pode sofrer influência do gênero, entretanto outros estudos ainda são necessários para se confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON SN, MARTIN MW, HUGHES AR, HARDEN TK, NEVE KA, BARRETT DA, MOLINOFF PB. Interaction of β -adrenergic receptors with the inhibitory guanine nucleotide-binding protein of adenylate cyclase in membranes prepared from cyc S49 lymphoma cells. **Biochem. Pharmacol.** 1988; 37: 4289-4297.

AHIMA RS. Central actions of adipocyte hormones. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism** 2005; 16: 7.

AHLQUIST RP. A study of adrenotropic receptors. **Am. J. Physiol.** 1948; 153: 586-600.

ALMEIDA J, GRASSI-KASSISSE DM. Relatório 3 – Doutorado direto. **Processo FAPESP 04/00679-4** 2006.

ATAL S, STUGARD C, DIGIROLAMO M. Altered pattern of glucose utilization in adipocytes with cellular enlargement. **Int. J. Obes.** 1991; 15(3): 55.

BARTNESS TJ. Dual innervation of white adipose tissue: some evidence for parasympathetic nervous system involvement. **J. Clin. Invest.** 2002; 110: 1235–1237.

BELTOWSKI J. Apelin and visfatin: Unique “beneficial” adipokines up-regulated in obesity? **Med. Sci. Monit.** 2006; 12(6): RA112-119.

BERG AH, COMBS TP, SCHERER PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **TRENDS in Endocrinology Metabolism** 2002; 13: 84–89.

BERN RM, KNABB RM, ELY SW, RUBIO R. Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. **Fed. Proc.** 1983; 42: 3136.

BJORNTORP P. Regional patterns of fat distribution. **Annals of Internal Medicine** 1985; 103: 994-995.

BOUCHER J, MASRI B, DAVIAUD D, GESTA S, GUIGNE C, MAZZUCOTELLI A, CASTAN-LAURELL I, TACK I, KNIBIEHLER B, CARPENE C, AUDIGIER Y, SAULNIER-BLACHE JS, VALET P. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. **Endocrinology** 2005; 146: 1764-1771.

BYLUND DB. Subtypes of α_1 and α_2 adrenergic receptors. **FASEB Journal** 1992; 6: 832-839.

CANDRALL DL, FRIED SK, FRANCENDESE AA, NICKEL M, DIGIROLAMO M. Lactate released from isolated rat adipocytes: influence of cell size, glucose concentration, insulin and epinephrine. **Horm. Metabol. Res.** 1983; 15: 326-329.

CAREY GB. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. **Adv. Exp. Med. Biol.** 1998; 441: 157-170.

CASPAR-BAUGUIL S, COUSIN B, GALINIER A, SEGAFREDO C, NIBBELINK M, ANDRE M, CASTEILLA L, PENICAUD L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. **FEBS Lett.** 2005; 579(17): 3487-3492.

CINTI S. The adipose organ. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** 2005; 73: 9-15.

CLIFFORD GM, LONDOS C, KRAEMER FB, VERNON RG, YEAMAN SJ. Translocation of hormone sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. **The Journal of Biol. Chemistry** 2000; 275(7): 5011-5015.

COTECCHIA S, SCHIWINN DA, RANDALL RR, LEFKOWITZ RJ, CARON MG, KOBILKA BK. Molecular cloning and expression of cDNA for the hamster alpha1-adrenergic receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1988; 85: 7159-7163.

DIGIROLAMO M, NEWBY FD, HILL JO. Blood lactate levels in human obesity. **Int. J. Obesity** 1989; 13: 394.

DIGIROLAMO M, NEWBY FD, LOVEJOY J. Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. **FASEB J.** 1992; 6(7): 2405-2412.

DIVERTIE GD, JENSEN MD, CRYER PE, MILLES JM. Lipolytic responsiveness to epinephrine in nondiabetic and diabetic humans.

DOLE VP. Effect of nucleic acid metabolites on lipolysis in adipose tissue. **J. Biol. Chem.** 1961; 236: 3125.

FAIN JN, MALBON CC. Regulation of adenylate cyclase by adenosine. **Mol. Cell. Biochem.** 1979; 25: 143.

FAINTRENIE G, GÉLOËN A. Lactate production by white adipocytes in relation to insulin sensitivity. **Am. J. Physiol.** 1996; 270(4 Pt 1):C1061-1066.

FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines and inflammation. **J. Allergy. Clin. Immunol.** 2005; 115: 911-919.

FLIERS E, KREIER F, VOSHOL PJ, HAVEKES LM, SAUERWEIN HP, KALSBECK A, BUIJS RM, ROMIJN JA. White Adipose tissue: getting nervous. **J. Neuroendocrinol.** 2003; 15(11):1005-1010.

FRANCESCONI EPMS, CREGE DRXO, ALMEIDA J, CHAIN EA, MUSCELLI E, SILVEIRA HJV, PAREJA JC, SPADARI-BRATFISCH RC, GÉLOËN A, GRASSI-

KASSISSE DM. Lactate and glycerol concentration in primary culture of isolated adipocytes from lean and obese patients. **FESBE**. 2006.

FRAYN KN, COPPACK SW, HUMPHREYS SM. Subcutaneous adipose tissue metabolism studied by local catheterization. **Int. J. Obes**. 1993; 17(3): S18-S21.

FRIEDMAN JM, HALAAS JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature** 1998; 395(6704): 763-770.

FUKUHARA A, MATSUDA M, NISHIRAWA M, SEGAWA K, TANAKA M, KISHIMOTO K, MATSUKI Y, MURAKAMI M, ICHISAKA T, MURAKAMI H, WATANABE E, TAKAGI T, AKIYOSHI M, OHTSUBO T, KIHARA S, YAMASHITA S, MAKISHIMA M, FUNAHASHI T, YAMANAKA S, HIRAMATSU R, MATSUZAWA Y, SHIMOMURA I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **SCIENCE** 2005; 307: 426-430.

GALITZKY J, LAFONTAN M, NORDENSTROM J, ARNER P. Role of vascular α_2 -adrenoceptor in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. **J. Clin. Invest**. 1993; 91: 1997-2003.

GARCIA MP, CHAVES SB, AZEVEDO RB. O tecido adiposo. **In: CURI R. et al., Entendendo a Gordura**. 2002; São Paulo, Ed. Manole.

GILMAN AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Ann. Rev. Biochem**. 1987; 56: 615-649.

GIMENO RE, KLAMAN LD. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. **Current Opinion in Pharmacology** 2005; 5: 122-128.

GRASSI-KASSISSE DM, WOLF-NUNES V, MIOTTO AM, FARIAS-SILVA E, BRITO ARMS, NUNES DS, SPADARI-BRATFICH RC. Sensitivity to β -adrenoceptor agonists of adipocytes from rats treated with an aqueous extract of *Croton cajucara Benth.* **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 2003; 55: 253-257.

HALUZÍK M, PARÍZKOVÁ J, HALUZÍK MM. Adiponectin and its role in the obesity induced insulin resistance and related complications. **Physiol. Res.** 2004; 53: 123-129.

HATORE ET, SAMPAIO-BARROS MM, FARIAS-SILVA E, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Adipocytes sensitivity to catecholamines is independent of stress intensity. **FESBE.** 2006.

HEALTON JM. The distribution of brown adipose tissue in the human. **J. Anat.** 1972; 112: 41-65.

HEINONEN MV, PURHONEN AK, MIETTINEN P, PAAKKONEN M, PIRINEN E, ALHAVA E, AKERMAN K, HERZIG KH. Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. **Regul. Pept.** 2005; 130: 7-13.

HELLSTROM L, LANGIN D, REYNISDOTTIR S, DAUZATS M, ARNER P. Adipocyte lipolysis in normal weight subjects with obesity among first degree relatives. **Diabetologia** 1996; 39: 921-928.

HENRY S, SCHNEITER P, JEQUIER E, TAPPY L. Effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on lactate release and local blood flow in subcutaneous adipose tissue of healthy humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 1996; 81(8): 2891-2895.

HOLM C, OSTERLUND T, LAURELL H, CONTRERAS JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. **Annu. Rev. Nutr.** 2000; 20: 365-393.

HONNOR RC, DHILLON GS, LONDOS C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes: I. Cell preparation, manipulation, and predictability in behavior. **J. Biol. Chem.** 1985a; 260: 15122-15129.

HONNOR RC, DHILLON GS, LONDOS C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes: II. Definition of steady state relationship with lipolytic and antilipolytic modulators. **J. Biol. Chem.** 1985b; 260: 15130-15138.

HOTAMISLIGIL GS, ARNER P, ATKINSON RL, SPIEGELMAN BM. Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. **Diabetes** 1997; 46: 451–455.

JANSSON PA, LARSSON A, SMITH U, LÖNNROTH P. Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. **J. Clin. Invest.** 1994; 93: 240-246.

JENSEN MD. Gender differences in regional fatty acid metabolism before and after meal ingestion. **Journal of Clinical Investigation** 1995; 96: 2297-2303.

JENSEN MD, CRYER PE, JOHNSON CM, MURRAY MJ. Effects of epinephrine on regional free fatty acid and energy metabolism in men and women. **Am. J. Physiol.** 1996; 270(2 Pt 1): E259-E264.

JOHNSON WJ, JANNE SY, BERNARD DW. Hormone sensitive lipase mRNA in both monocyte and macrophage forms of the human THP-1 cell line. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.** 2000; 126: 543-552.

KELLY KL, RUBERMAN NB, CHEN KS. Phosphatidylinositol – 3 – kinase in isolated rat adipocytes – Activation by insulin and subcellular distribution. **J. Biol. Chem.** 1992; 267: 3423-3428.

KENNEDY GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 1953; 140(901): 578-596.

KERN PA, SAGHIZADEH M, ONG JM, BOSCH RJ, DEEM R, SIMSOLO RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **Journal of Clinical Investigation** 1995; 95: 2111–2119.

KLEIN J, PERWITZ N, KRAUS D, FASSHAUER M. Adipose tissue as source and target for novel therapies. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism** 2006; 17 (1): 26-32.

KOBILKA BK, DIXON RAF, FRIELLE T, DOHLMAN HG, BOLANOWSKI MA, SIGAL IS, YANG-FENG TL, FRANCKE U, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. cDNA for the human β_2 -adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet derived growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1987; 84: 46-50.

KOTANI K, TOKUNAGA K, FUJIOKA S, KOBATAKE T, KENO Y, YOSHIDA S, SHIMOMURA I, TARUI S, MATSUZAW Y. Sexual dimorphism of age-related changes in whole body fat distribution in the obese. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders** 1994; 18: 207-212.

KREIER F, FLIERS E, VOSHOL PJ, VAN EDEN CG, HAVEKES LM, KALSBECK A, VAN HEIJNINGEN CL, SLUITER AA, METTENLEITER TC, ROMIJN JA, SAUERWEIN HP, BUIJS RM. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat - functional implications. **J. Clin. Invest.** 2002; 110:1243–1250.

KUBOTA N, TERAUCHI Y, YAMAUCHI T, KUBOTA T, MOROI M, MATSUI J, ETO K, YAMASHITA T, KAMON J, SATOH H, YANO W, FROGUEL P, NAGAI R, KIMURA S, KADOWAKI T, NODA T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. **J. Biol. Chem.** 2002; 277: 25863–25866.

LAFONTAN M, BERLAN M. Fat Cell α_2 -adrenoceptors: The regulation of fat cell function and lipolysis. **Endocr. Rev.** 1995; 16(6): 716-738.

LAFONTAN M, BERLAN M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? **TRENDS in Pharmacological Sciences** 2003; 24(6): 276-283.

LAFONTAN ML, DANG-TRAN L, BERLAN M. Alpha-adrenergic antilipolytic effect of adrenaline in human fat cells of the thigh: comparison with adrenaline responsiveness of different fat deposits. **Eur. J. Clin. Invest.** 1979; 9:261-266.

LANDS AM, ARNOLD A, MCAULIFF JP, LUDUENA FP, BROWN TG JR. Differentiation of receptors systems activated by sympathomimetic amines. **Nature** 1967b; 241: 597-598.

LANDS AM, LUDUENA FP, BUZZO HJ. Differentiation of receptor responsiveness to isoproterenol. **Life Science** 1967a; 6(21): 2241-2249.

LANGIN D, HOLM C, LAFONTAN M. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulation of lipid metabolism. **Proc. Nutr. Soc.** 1996; 55: 93-109.

LEY CJ, LEES B, STEVENSON JC. Sex and menopause associated changes in body fat distribution. **American Journal of Clinical Nutrition** 1992; 55: 950-954.

MACHIDA CA, BRUNZOW JR, SEARLES, RP VAN TOL H, TESTER B, NEVE KA, TEAL P, NIPPER V, CIVELLI O. Molecular cloning and expression of the rat β_1 receptor gene. **J. Biol. Chem.** 1990; 265: 12960-12965.

MAEDA N, SHIMOMURA I, KISHIDA K, NISHIZAWA H, MATSUDA M, NAGARETANI H, FURUYAMA N, KONDO H, TAKAHASHI M, ARITA Y, KOMURO R, OUCHI N, KIHARA S, TOCHINO Y, OKUTOMI K, HORIE M, TAKEDA S, AOYAMA T, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nat. Med.** 2002; 8: 731-737.

MAURIÈGE P, GALITZKY J, BERLAN M, LAFONTAN M. Heterogeneous distribution of beta and alpha-2 adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences. **Eur. J. Clin. Invest.** 1987; 17: 156-165.

MAURIÈGE P, PRUD'HOMME D, LEMIEUX S, TREMBLAY A, DESPRÉS JP. Regional differences in adipose tissue lipolysis from lean and obese women: existence of postreceptor alterations. **American Physiological Society** 1995; E341-E350.

MERKLIN R. Growth and distribution of human fetal brown fat. **Anat. Rec.** 1973; 178: 637-646.

NAHMIAS C, BLIN N, ELALOUF JM, MATTEI MG, STROSBERG AD, EMORINE LJ. Molecular characterization of the mouse β_3 -adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. **EMBO J.** 1991; 10: 3721-3727.

NEWBY FB, BAYO F, THACKER SV, SYKES MN, DIGIROLAMO M. Effects of streptozotocin induced diabetes on glucose metabolism and lactate released by isolated fat cells from young and older, moderately obese rats. **Diabetes** 1989; 38: 237-243.

NEWBY FB, WILSON LK, THACKER SV, DIGIROLAMO M. Adipocyte lactate production remains elevated during refeeding after fasting. **Am. J. Physiol.** 1990; 259: E865-E871.

OHISALO JJ, RANTA S, HUHTANIEMI IT. Inhibition of adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and lipolysis by adenosine analogs in human subcutaneous adipocytes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 1984; 58: 32-35.

PAUL P, LAHAYE C, DELAGRANGE P, NICOLAS JP, CANET E, BOUTIN JA. Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1999; 290(1): 334-340.

POND CM. Adipose tissue and the immune system. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** 2005; 73: 17-30.

PRICE TM, O'BRIEN SN, WELTER BH, GEORGE R, ANANDJIWALA J, KILGORE M. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase – Possible mechanism of body fat distribution. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 1998; 178: 101-107.

RANTA S, KIVILUOTO T, NEWBY AC, OHISALO JJ. Assay of adenosine in human adipose tissue. **Acta. Endocrinologica** 1985; 110: 429-432.

REBUFFÉ-SCRIVE, ANDERSON B, OLBE L, BJORNTORP P. Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of nonobese men and women. **Metabolism** 1989; 38: 453-458.

RICHELSEN B. Increased α_2 – but similar β -adrenergic receptor activities in subcutaneous gluteal adipocytes from females compared with males. **Eur. J. Clin. Invest.** 1986; 16: 302-309.

RODBELL M. Metabolism of isolated fat cells – Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. **J. Biol. Chem.** 1964; 239: 375-380.

ROMIJN JA, FLIERS E. Sympathetic and parasympathetic innervation of adipose tissue: metabolic implications. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care** 2005; 8(4): 440-444.

ROMSOS DR, LEVEILLE GA. Effect of diet on activity of enzymes involved in fatty acid and cholesterol synthesis. **Adv. Lipid. Res.** 1974; 12: 97-102.

RONTI T, LUPATTELLI G, MANNARINO E. The endocrine function of adipose tissue: an update. **Clin. Endocrinol. (Oxf)** 2006; 64(4): 355-365.

SAGGERSON ED, MCALLISTER TWJ, BAHT HS. Lipogenesis in rat brown adipocytes – Effects of insulin and noradrenaline, contributions from glucose and lactate as precursors and comparisons with adipocytes. **Biochem. J.** 1988; 251: 701-709.

SANDQVIST MM, ERIKSSON JW, JANSSON PA. Increased lactate released per fat cell in normoglycemic first-degree relatives of individuals with type 2 diabetes. **Diabetes** 2001; 50(10): 2344-2348

SCHWABE U, REINHOLD E, ERBLER HC. Adenosine release from fat cells: effect on cyclic AMP levels and hormone actions. **Advances in cyclic nucleotide research** 1975; 569.

SLAVIN BG, BALLARD KW. Morphological studies on the adrenergic innervation of white adipose tissue. **Anat. Rec.** 1978; 191: 377–389.

STATNICK MA, BEAVERS LS, CONNER LJ, COROMINOLA H, JOHNSON D, HAMMOND CD, RAFAELOFFPHAIL R, SENG T, SUTER TM, SLUKA JP, RAVUSSIN E, GADSKI RA, CARO JF. Decreased expression of apM1 in omental and

subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. **Int. J. Exp. Diabetes Res.** 2000; 1: 81-88.

TATEMOTO K, HOSOYA M, HABATA Y, FUJII R, KAKEGAWA T, ZOU MX, KAWAMATA Y, FUKUSUMI S, HINUMA S, KITADA C, KUROKAWA T, ONDA H, FUJINO M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1998; 251: 471-476.

THACKER SV, NICKEL M, DIGIROLAMO, M. Effects of food restriction on lactate production from glucose. **Am. J. Physiol.** 1987; 253: E336-E342.

TORRES-MARQUES E, ROMERO-AVILA MT, GONZALES-ESPINOSA C, GARCIA-SAINZ A. Characterization of white fat cell alpha1b-adrenoceptors. **Mol. Pharmacol.** 1992; 42: 403-406

VERNON RG, FINLEY E, WATT PW. Adenosine and the control of adrenergic regulation of adipose tissue lipolysis during lactation. **J. Dairy. Sci.** 1990; 74: 695-705.

WAHRENBERG H, LÖNNQVIST F, ARNER P. Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. **J. Clin. Invest.** 1989; 84: 458-467.

WARNE JP. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. **J. Endocrinol.** 2003; 177(3): 351-355.

WATSON PF, MORRIS GF. Cold shock injury in animal cells. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 1987; 41: 311-340.

WILLIAMS CM. Lipid metabolism in women. **Proceedings of the Nutrition Society** 2004; 63: 153-160.

XIAO R, JI X, LAKATTA EG. Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. **Mol. Pharmacol.** 1995; 47: 322-329.

YOUNGSTROM TG, BARTNESS TJ. Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in the Siberian hamster. **Am. J. Physiol.** 1995; 268: R744–R751.

ZHONG H, MINNEMAN KP. α_1 – adrenoceptor subtypes. **Eur. J. Pharmacol.** 1999; 375: 261-276.