



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANILO ROBERTO XAVIER DE OLIVEIRA CREGE

**ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO E CARDIOVASCULAR
DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA POR
QUATRO SEMANAS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Daniilo Roberto Xavier de Oliveira
Crege
e aprovada pela Comissão Julgadora.
[Assinatura]

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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Dora Maria Grassi Kassisse

Campinas, 2012

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

C861a

Crege, Danilo Roberto Xavier de Oliveira, 1981-
Análise do perfil metabólico e cardiovascular de ratos
alimentados com dieta hiperlipídica por quatro semanas /
Danilo Roberto Xavier de Oliveira Crege. – Campinas, SP:
[s.n.], 2012.

Orientador: Dora Maria Grassi Kassinse.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dieta hiperlipídica. 2. Adipócitos. 3. Lactatos.
4. Rato. 5. Coração - Hipertrofia. I. Grassi-Kassinse,
Dora Maria, 1964-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Metabolic and cardiovascular analysis in rats fed with high-fat diet during four weeks

Palavras-chave em Inglês:

High-fat diet

Adipocytes

Lactates

Rats

Heart - Hypertrophy

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Dora Maria Grassi Kassinse [Orientador]

Miguel Arcanjo Areas

Fernanda Ramos Gadelha

Carlos Alberto Silva

Iraídes Nunes dos Santos

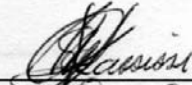
Data da defesa: 13-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 13 de fevereiro de 2012

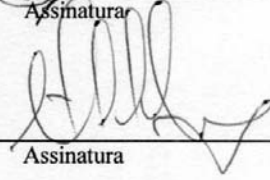
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis (Orientadora)



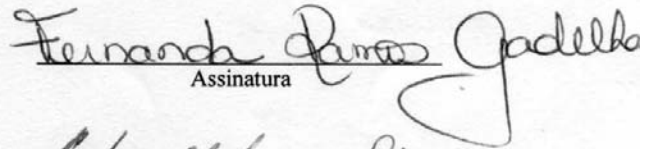
Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



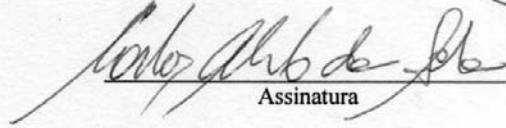
Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva



Assinatura

Profa. Dra. Iraídes Nunes dos Santos



Assinatura

Profa. Dra. Gislaine Ventrucci

Assinatura

Prof. Dr. Armindo Antonio Alves

Assinatura

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior

Assinatura

DEDICATÓRIA

Não teria como dedicar este trabalho para outras pessoas, que não fossem meus pais. Eles sempre apoiaram minhas escolhas, me deram oportunidade e condições de estudo, sem as quais não teria conseguido chegar até aqui.

Amo muito vocês! Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Antes de começar redigir a última parte que está faltando nesta tese gostaria de deixar registrado que, mais difícil que escrever resultados e discussões, é expressar em palavras o meu agradecimento pelas pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse concluído. Não gostaria de ser injusto e, involuntariamente, esquecer de alguém, por isso, de antemão já deixo meu muito obrigado a todos que de alguma forma possibilitaram a realização deste trabalho.

Tive muitas dificuldades para começar este texto e por isso fui fazer a leitura do que havia escrito nos agradecimentos do mestrado. O mais interessante que percebi é que, apesar de alguns anos terem se passado, a grande maioria daquelas pessoas ainda são presentes em minha vida e continuam acompanhando minha trajetória. Mesmo que muitas vezes os caminhos e circunstâncias proporcionadas pela vida às vezes nos distanciem, é bom saber que estão ao meu lado. Saibam que estarei sempre à disposição para ajudá-los quando for preciso.

Inicialmente gostaria de agradecer a todos os amigos que foram feitos nestes nove anos de LABEEST. Por mais que seja algo naturalmente esperado em um ambiente de trabalho, a amizade e companheirismo de vocês foi fundamental para conseguir concretizar esta pesquisa. Mantendo a famosa hierarquia da “pirâmide”, nada mais justo que começar lembrando dos amigos da “velha guarda” do laboratório: Alê, André, Aline, Aglécio, Danuza, Débora, Edgar, Edla (Tia), Elaine, Elis, Geruza, Heder, Heloisa, Iraídes, Ju, Karina (Sebe), Márcia (Ponta Esquerda), Maria Cândida, Marília, Silvia e Vivi. Em um passado mais recente: Aline (Caloi), Gaby, Gustavo, Guto, Lari, Marcela e Tim. Todos vocês tiveram participação direta em minha vida ao longo de todos estes anos juntos, seja durante a realização de experimentos, mas também em almoços no bandeirão, viagens e impagáveis tardes no Star Clean!

Ao meu amigo Alê (Miotto), que teve muita paciência para ensinar parte das técnicas utilizadas neste trabalho e aguentou meus “desabafos” quando a cânula não entrava na artéria! Foi a primeira pessoa que me deu oportunidade de ministrar uma palestra e deixo aqui meu muito obrigado por tudo que me ensinou durante estes anos.

Ao Heder Frank (Starling!), sempre disposto a ajudar no que fosse preciso, companheiro de disciplinas (sofia de insônia...) e com quem dividi grande parte das angústias e dificuldades profissionais no começo da carreira acadêmica.

Ao Guto e Tim que conseguiram ser meus “bixos” três vezes!! Parceiros de experimentos sem os quais seria impossível concluir esta pesquisa. Obrigado por toda força que me deram nestes anos! Tim, tem duas latinhas liberadas para cada um!

A todos os amigos dos outros laboratórios do departamento que também não mediram esforços para ajudar nos experimentos, além de ótimos companheiros de churrascos! Amarilys, Carol Babalu, Zé, Leandro, Anderson, Felipe, Emilianne, Bread, Romântico, Gi, Claudinha, Alessandrino, Urso, Mandrake, Letícia, Helena, Thiago, deixo aqui o meu muito obrigado.

Aos alunos do professor Miguel: Fernanda, Chico, Gu, Marcelo e Clodoaldo, com quem dividimos o laboratório nos últimos anos e compartilhamos ótimos momentos de conversas e risadas.

Ao Luizão, também aluno do professor Miguel, deixo um agradecimento especial por toda ajuda dada para elaboração desta tese. Muito obrigado por tudo que fez por mim nestes anos, pois sem sua colaboração não teria conseguido concluir este trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica: Alexandra, Juvenal, Léscio, Marcelo, Marise, Priscila e Washington.

A Andréa da secretaria que, desde minha entrada na pós-graduação, sempre me ajudou muito nas dúvidas e nos problemas que levava.

Aos velhos amigos Rafael e Alan, que participam da minha vida desde as caminhadas para o futebol no Regatas até hoje, e com quem gostaria de compartilhar mais este momento.

As amigas ausentes Fer Redondo e Milla que, onde quer que estejam, olham por mim e iluminam o caminho que vou percorrer. Apesar do tempo que nos deixaram, vocês nunca serão esquecidas.

Ao amigo Rafael Cofiño (Adriano!), parceiro diário nos últimos anos, que segurou muitos problemas para que eu pudesse concluir este trabalho.

A minha grande amiga Ylane, pessoa ímpar, por quem tenho um carinho enorme e com quem compartilhei momentos excelentes da minha vida, mesmo às vezes tendo que esperar até tarde para comer a pipoca! Saiba que pode contar comigo sempre!

Aos amigos do ETECAP, Fisioterapia PUCCAMP e da FEF, com os quais vivi, em diferentes fases, os melhores momentos de minha vida. Apesar de muitas vezes encontrá-los bem menos do que gostaria, vocês estarão sempre comigo.

Aos amigos da turma do Chupim e da Coalisão! Este trabalho justifica algumas das ausências nos “poucos” eventos que realizam! É muito bom poder dividir os bons momentos e alegrias da vida com vocês, mas principalmente saber que sempre posso contar quando as dificuldades surgem.

Aos amigos da vida, Aruan, Duzão, Jecão, Lê, Lee, Louis, Nucci, Pateta, Pato, Raí, Rogito! Longas histórias para contar!

A Nathalia que me acompanhou durante praticamente todos estes anos do doutorado. Muito obrigado por todo apoio que me deu, principalmente nos momentos que desanimava e achava que não iria conseguir. Seu suporte foi fundamental! Independente dos caminhos que a vida nos proporcione para o futuro, agradeço por tudo que fez por mim. Seu lugar estará em meu coração para sempre.

A toda minha família: Tios, primos, avós... Apesar de muitas vezes a rotina diária nos separar por longos períodos, vocês sempre serão parte constante da minha vida. Obrigado por tudo!

Ao meu irmão Pedro e minha cunhada Rita. O apoio de vocês sempre foi fundamental para atingir mais este objetivo. Muito obrigado pelas conversas, conselhos, carinho e companheirismo! Amo vocês!

A todos os meus alunos, em especial a Angélica Corrêa (*in memoriam*), que tive oportunidade de tentar passar um pouco do que é a Fisiologia. Nunca parem de buscar o conhecimento!

Aos professores e amigos do UniAnchieta que também me ajudaram muito nestes anos de trabalho juntos.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados ao longo destes anos de convívio.

Ao Professor Ernesto José Ottaviano (*in memoriam*) que foi o responsável pelo início da minha carreira acadêmica. Muito obrigado pela oportunidade, “brincas” e conselhos!

Ao Professor Francesco Langone (*in memoriam*) que, mesmo sem me conhecer, permitiu que eu realizasse estágio em seu laboratório e foi o responsável direto para que iniciasse os estudos em Fisiologia. Muito obrigado, professor! Parabéns pelo brilhante trabalho que desenvolveu.

A Professora Regina Célia Spadari que nos meus primeiros anos de laboratório sempre esteve disposta a me ajudar, ensinou muito de Fisiologia e contribui diretamente com minha formação profissional.

A Professora Dora Maria Grassi-Kassisse. Dizer simplesmente muito obrigado é pouco perto de tudo que fez por mim nestes anos. Serei sempre grato por tudo que fez pelo meu desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço pelos ensinamentos, por ajudar na minha primeira orientação de TCC, por ensinar como montar uma aula e compartilhar as experiências de coordenação. Peço desculpas se às vezes não consegui atender as expectativas em mim depositadas. Espero que um dia consiga tratar meus futuros orientandos da mesma forma que fez comigo, sempre com carinho, disposição para ajudar e como uma amiga. Obrigado por tudo!

Ao Programa de pós graduação em Biologia Funcional e Molecular e a FAEPEX pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Animais.....	10
3.2 Grupos e dieta.....	10
3.3 Controle da evolução ponderal e consumo de ração.....	11
3.4 Coleta de sangue e análise das concentrações plasmáticas e sanguíneas.....	11
3.5 Cateterização arterial e venosa.....	12
3.6 <i>Clamp</i> euglicêmico-hiperinsulinêmico.....	12
3.7 Isolamento de adipócitos.....	13
3.8 Captação de glicose pelo tecido adiposo.....	13
3.9 Estudo farmacológico.....	14
3.10 Dosagem de lactato no meio de incubação.....	15
3.11 Dosagem de glicerol no meio de incubação.....	15
3.12 Análise morfométrica dos adipócitos.....	16
3.13 Parâmetros eletrocardiográficos.....	16

3.14 Histologia cardíaca.....	16
3.15 Análise dos resultados.....	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXOS.....	125

RESUMO

A mudança no estilo de vida, principalmente por conta do sedentarismo e da ingestão de dietas com grandes quantidades calóricas, tem aumentado significativamente a prevalência de doenças crônico-degenerativas na população. Diversas pesquisas mostram que a obesidade é responsável por predispor uma grande variedade de distúrbios metabólicos que muitas vezes aparecem combinados levando a chamada síndrome metabólica. A síndrome metabólica é caracterizada pela presença de um grupo de fatores de risco como obesidade central, resistência à insulina, aumento da pressão arterial e esteatose hepática. Nosso laboratório realiza desde 1996, estudos envolvendo a utilização de dietas hiperlipídicas e as implicações nestes tecidos, a fim de contribuir para o esclarecimento de como cardiopatias e alterações metabólicas são instaladas nestes modelos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações metabólicas e cardiovasculares em ratos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica por quatro semanas e comparar com outros modelos estudados no laboratório. Para análise das alterações metabólicas nos ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica foram utilizadas técnicas de: *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, isolamento de adipócitos do pâncreas epididimal para verificação da captação de glicose e produção de lactato e glicerol, além da análise morfométrica destes adipócitos. A análise das alterações cardiovasculares foi realizada utilizando parâmetros eletrocardiográficos e procedimentos de histologia cardíaca. Nossos resultados mostraram que ratos, que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica por quatro semanas, apresentaram resistência à insulina verificada pela redução na taxa de infusão de glicose durante o *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico. Além disso, a captação de glicose pelos adipócitos isolados da região epididimal também foi significativamente menor. A redução na captação de glicose, provavelmente, foi responsável pela diminuição na produção de lactato por estes adipócitos isolados dos ratos hiperlipidêmicos. A lipólise basal não foi alterada, entretanto, a estimulada por agonistas adrenérgicos apresentou-se diminuída, sendo que estas alterações não comprometeram a morfometria dos adipócitos epididimais. Os ratos dislipidêmicos também apresentaram alterações cardíacas, como a hipertrofia, avaliada pela análise histológica do coração. Estes resultados demonstram que a ingesta de dieta hiperlipídica por quatro semanas é capaz de promover alterações metabólicas, sugerindo instalação do quadro de resistência à insulina, sem causar alterações na glicemia, além

de levar a hipertrofia cardíaca, sendo, portanto, um modelo útil para o estudo de complicações iniciais decorrentes da ingestão de dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

Changes in lifestyle, especially due to sedentarism and intake of high caloric diets have significantly increased the prevalence of chronic diseases in the population. Many researches show that obesity is responsible to a huge variety of metabolic disorders that usually appears combined leading to a disease known as the metabolic syndrome. Metabolic syndrome is characterized by the presence of a group of risk factors such as central obesity, insulin resistance, increase in blood pressure and hepatic steatosis. Our laboratory conducts, since 1996, studies involving the use of high-fat diet and the implications in these tissues in order to contribute to the comprehension of how cardiopathies and metabolic disorders are installed in these models. The aim of this study was to evaluate the metabolic and cardiovascular disorders in rats fed with high-fat diet during four weeks and to compare this information with other models used in our laboratory. To analyze the metabolic changes in rats that were fed with high-fat diet, we used the following techniques: euglycemic-hyperinsulinemic clamp, adipocytes isolation from epididymal panniculus, for the verification of glucose uptake, lactate and glycerol production, besides morphometric analysis of these adipocytes. The analyses of cardiovascular disorders were performed using electrocardiographic parameters and cardiac histology procedures. Our results demonstrated that, rats, fed with high-fat diet during four weeks showed insulin resistance, verified by reduction in the rate of glucose infusion, during euglycemic-hyperinsulinemic clamp. In addition, glucose uptake by isolated adipocytes from epididymal tissue was significantly lower. The reduction in glucose uptake probably was the responsible for diminish lactate production by these isolated adipocytes of hyperlipidemic rats. Basal lipolysis was not altered, however, the one stimulated by adrenergic agonists was reduced, and these changes did not affect the morphometry of epididymal adipocytes. The dislipidemic rats also showed cardiac alterations, such as hypertrophy, observed in a hystologic analyses of the heart. These results demonstrate that the intake of high-fat diet during for weeks is able to promote metabolic disorders, suggesting insulin resistance development, however, without promotes glycemetic alterations, besides leads to cardiac hypertrophy, and is therefore, a useful model to study these initial complications resulting from the ingestion of high-fat diet.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DG - 2-[1,2-³H]-desoxiglicose

AgRP - Peptídeo relacionado ao agouti

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

AMPK - Proteína quinase dependente de AMP

aPKC - Proteína quinase C atípica

AS160 - Substrato 160kD da Akt

ATP - Adenosina trifosfato

AUC – Área sob a curva

BGC = Liberação basal de glicerol dos animais controle

BGD = Liberação basal de glicerol dos animais que ingeriram dieta hiperlipídica

BLC = Liberação basal de lactato ratos controle

BLD = Liberação basal de lactato dos ratos que ingeriram dieta hiperlipídica

bpm – Batimentos por minuto

(C) – Ratos controle

CART - Fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente

(D) – Ratos que ingeriram dieta hiperlipídica por quatro semanas

DAG - Diacilglicerol

dL – Decilitros

ECG – Eletrocardiograma

EPM – Erro padrão da média

FC - Frequência cardíaca

FOXO - *Forkhead dependent transcription factors*

g – Gramas

G_i – Proteína G inibitória

GIR - Taxa de infusão de glicose

GLUTs - *Glucose Transporters*

G_s – Proteína G estimulatória

HDL - Lipoproteínas de alta densidade

HE – Hematoxilina-eosina

HSL – Lipase hormônio sensível
im. – Intramuscular
ip. – Intraperitoneal
IRS - Substratos do receptor de insulina
Kcal – Kilocaloria
Kg – Quilograma
KRBA – Krebs Ringer Bicarbonato Albumina
LABEEST - Laboratório de estudo do estresse
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LPL - Lipoproteína lípase
MCTs - Transportadores de monocarboxilato
mg – Miligramas
mL – Mililitros
mm - Milímetros
mM - Milimolar
ms - Milisegundos
mTOR (*mammalian target of rapamycin*)
nm – Nanômetros
nM – Nanomolar
NPY - Neuropeptídeo Y
PAI-1 - Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PDK1 - Proteína quinase dependente de fosfoinositídeo
PI3-3,4,5 P₃ - Fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato
PI3-K - Fosfatidil inositol 3 quinase
PKA - Proteína quinase A
PKC - Proteína quinase C
PLC - Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato pela fosfolipase C
POMC - Pró-ópio-melanocortina
PPAR - Receptor proliferador-ativador de peroxissomos
SNC – Sistema nervoso central
SNS - Sistema nervoso simpático

TAG - Triacilgliceróis

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

VFC - Variabilidade da frequência cardíaca

VLDL - Lipoproteína de muita baixa densidade

μg – Microgramas

μL – Microlitros

μm - Micrometros

μm^2 - Micrometros quadrados

μM – Micromolar

μmol - Micromol

μU – Microunidades

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição da dieta hiperlipídica.....	11
Tabela 2 -	Valores glicêmicos (mg/dL), valores de taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) e área sob a curva (AUC: Glicemia; mg/dL; GIR; mg/Kg/min) obtidos a partir do ensaio de <i>clamp</i> euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos controle (C, n=7), submetidos a quatro semanas de tratamento com dieta hiperlipídica (D, n=6) ou que realizaram quatro semanas de natação (N, n=6).....	35
Tabela 3 -	Parâmetros eletrocardiográficos em ratos controle (C, n=6) ou submetidos a quatro semanas de tratamento com dieta hiperlipídica (D, n=5).....	83
Tabela 4 -	Valores da área de cardiomiócitos (μm^2) de ratos controle (C, n=4) ou submetidos ao tratamento com quatro semanas de dieta hiperlipídica (D, n=10).....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Média do peso final dos animais pertencentes aos grupos controle (n=11) e dieta (n=9), comparado a média do peso corporal inicial, considerando os dois grupos (n=20)..... **19**
- Figura 2 - Média do consumo de ração na última semana de tratamento com dieta padrão (n=11) ou hiperlipídica (n=9), comparado a média da ingesta inicial, considerando os dois grupos (n=20)..... **21**
- Figura 3 - Concentração de colesterol plasmático (mg/dL) dos animais do grupo controle (n=11) e tratados com dieta hiperlipídica (n=15)..... **24**
- Figura 4 - Concentrações plasmáticas de triacilgliceróis (mg/dL) dos animais do grupo controle (n=11) e tratados com dieta hiperlipídica (n=15)..... **26**
- Figura 5- Foto ilustrativa do tecido hepático de ratos controle (A) e submetidos à dieta hiperlipídica (B), ao longo de quatro semanas..... **27**
- Figura 6- Concentrações sanguíneas de glicose (mg/dL) dos animais do grupo controle (n=7) e tratados com dieta hiperlipídica (n=11)..... **29**
- Figura 7- Valores glicêmicos (A, mg/dL) e taxa de infusão de glicose (B, GIR mg/Kg/min) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos controle (n=7) ou submetidos a quatro semanas de ingestão de dieta hiperlipídica (n=6) **36**
- Figura 8- Efeito de diferentes concentrações de insulina na captação de 2-D-[2,6-³H] deoxiglicose (2-DG), pelos adipócitos epididimais isolados de ratos controle (n=9-11) ou submetidos a tratamento com dieta hiperlipídica por quatro semanas (n=4-5)..... **39**
- Figura 9- Efeito de diferentes concentrações de noradrenalina na captação de 2-D-[2,6-³H] deoxiglicose (2-DG), pelos adipócitos epididimais isolados de ratos controle ou submetidos a tratamento com dieta hiperlipídica..... **41**
- Figura 10 Efeito da isoprenalina (1000 nM) na captação de 2-D-[2,6-³H] deoxiglicose (2-DG), pelos adipócitos epididimais isolados de ratos controle (n=4) ou

- submetidos a tratamento com dieta hiperlipídica por quatro semanas **43**
(n=6).....
- Figura 11- Liberação de lactato basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6$ células.60 min.) por diferentes concentrações de noradrenalina para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão (n=4-6) ou hiperlipídica (n=4-9) por quatro semanas..... **53**
- Figura 12- Liberação de lactato basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6$ células.60 min.) por diferentes concentrações de isoprenalina para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão (n=4-6) ou hiperlipídica (n=4-8) por quatro semanas..... **55**
- Figura 13- Liberação de lactato basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6$ células.60 min.) por diferentes concentrações de noradrenalina juntamente com isoprenalina (1000 nM) para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão (n=10-16) ou hiperlipídica (n=10-16) por quatro semanas..... **57**
- Figura 14- Liberação basal de lactato na presença ou ausência de propanolol (1000 nM) para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão (n=6) ou hiperlipídica (4-6) por quatro semanas..... **59**
- Figura 15- Liberação basal e estimulada de lactato na ausência ou presença de isoprenalina (1000 nM) e propanolol (1000 nM) para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão (n=6-7) ou hiperlipídica (n=4-6) por quatro semanas..... **60**
- Figura 16- Liberação de lactato em resposta a diferentes concentrações de noradrenalina juntamente com propanolol (1000 nM) de adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão (n=4-7) ou hiperlipídica (n=4-6) por quatro semanas..... **61**
- Figura 17- Liberação basal de lactato na presença ou ausência de ICI 118,551 (50 nM) para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão (n=3-10) ou hiperlipídica (n=5-6)..... **63**

Figura 18- Liberação basal e estimulada de lactato na ausência ou presença de isoprenalina (1000 nM) e ICI 118,551 (50 nM) para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=3-10) ou hiperlipídica (n=6-9).....	64
Figura 19- Liberação de lactato em resposta a diferentes concentrações de noradrenalina juntamente com ICI 118,551 (50 nM) de adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=3-10) ou hiperlipídica (n=3-9).....	65
Figura 20 Liberação de glicerol em resposta à diferentes concentrações de noradrenalina para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=3-7) ou hiperlipídica (n=3-5) por quatro semanas.....	71
Figura 21- Liberação de glicerol em resposta à isoprenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=3-7) ou hiperlipídica (n=3-7) por quatro semanas.....	73
Figura 22- Liberação de glicerol em resposta a diferentes concentrações de noradrenalina juntamente com isoprenalina (1000 nM) de adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=5-7) ou hiperlipídica (n=3-6) por quatro semanas.....	75
Figura 23- Morfometria de adipócitos isolados do pâncreas adiposo da região epididimal de ratos controle e de ratos ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de quatro semanas.....	82

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, principalmente entre as sociedades ocidentais, tem sido observado que as doenças crônico-degenerativas vêm aumentando significativamente a prevalência na população. Grande parte desta elevação deve-se a mudança no estilo de vida, principalmente por conta do sedentarismo e da ingestão de dietas com grandes quantidades calóricas (KLAUS, 2005; BLAIR, 2009; MUROS MOLINA, 2011).

Atualmente, as taxas de obesidade têm assumido proporções epidêmicas. Considerando todo o mundo, mais de um bilhão de adultos estão acima do peso, além de outros 400 milhões que são classificados como obesos (KOPLAN; LIVERMAN; KRAAK, 2005; Van DIEREN et al., 2010; VICKERS, 2011). Estudos indicam que mais de 20 milhões de crianças, abaixo dos cinco anos, estão acima do peso. Este aumento significativo nos índices de obesidade infantil e outros distúrbios metabólicos associados irão refletir na quantidade de adultos obesos no futuro. A previsão para 2015 é que o número de obesos supere a marca de 2,3 bilhões de indivíduos (AHMED; ONG; DUNGER, 2009; HAN; LAWLOR; KIMM, 2010). Um ponto importante nestas estatísticas é o impacto na saúde dos indivíduos já que, mesmo quadros leves de obesidade, estão relacionados com redução na expectativa de vida (VonDIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

A obesidade é responsável por predispor uma grande variedade de distúrbios metabólicos que, na maioria das vezes, leva ao desenvolvimento da síndrome metabólica. A síndrome metabólica é caracterizada pela presença de um grupo de fatores de risco como obesidade central, resistência à insulina, aumento na pressão arterial e esteatose hepática (SHAW; HALL; WILLIAMS, 2005; WATANABE; HOJO; NAGAHARA, 2007; PICCHI et al., 2011). O desenvolvimento da obesidade e da síndrome metabólica pode ser resultado de uma série de interações, que incluem a inatividade física, ingestão alimentar, fatores genéticos e o ambiente.

Para muitos autores, a ingestão de uma dieta rica em gordura é um dos fatores que mais contribuem para o desenvolvimento da obesidade e da síndrome metabólica (BRAY; PAERATAKUL; POPKIN, 2004; ESPOSITO; CERIELLO; GIUGLIANO, 2007). Além de complicações metabólicas, as dietas ricas em gordura também estão relacionadas com o aumento

do risco cardiovascular (MITROU et al., 2007). Segundo dados do Ministério da Saúde (2008), as doenças cardiovasculares são as principais causas de mortalidade e morbidade no Brasil.

Existem diversos modelos experimentais descritos na literatura para estudo de doenças como a obesidade, a síndrome metabólica e a Diabetes Mellitus. Um dos modelos que pode ser utilizado é o tratamento de ratos com dietas hiperlipídicas. A utilização destas dietas associadas ao sedentarismo é capaz de promover distúrbios no metabolismo de lipídeos e alterar as características e funcionamento de outros tecidos como o hepático, cardíaco e adiposo. Uma das primeiras alterações evidenciadas nos ratos que fazem ingestão de dieta hiperlipídica refere-se à instalação do quadro de dislipidemia. A dislipidemia está relacionada com aumento nas concentrações de triacilgliceróis e/ou colesterol, ou ainda redução nas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Este quadro está diretamente ligado com a obesidade e a síndrome metabólica, sendo um ponto central para o aumento do risco cardiovascular (FRANSSEN et al., 2011).

A grande maioria das pesquisas envolvendo modelos de dislipidemia é realizada com camundongos geneticamente modificados (WANG et al., 2007; TAKEDA et al., 2008; RAŽNY et al., 2010; BARASCUK et al., 2011; HENSLER et al., 2011) e coelhos (RAI; HARE; ZULLI, 2009; PRIOR et al., 2010; ZHONG et al., 2011). Os estudos com ratos são menos frequentes, uma vez que para o quadro de dislipidemia ser instalado é necessário associar o ácido cítrico à dieta, além de que a administração deve acontecer enquanto eles são jovens. Nosso laboratório optou por implementar o modelo de dislipidemia em ratos, devido todas as técnicas utilizadas no laboratório, como isolamento de adipócitos, reatividade vascular, átrio direito isolado, eletrocardiografia e pressão arterial serem realizadas nesta espécie.

As dislipidemias podem ter origem primária, que está relacionada com fatores genéticos ou pode ser de origem secundária, quando é desencadeada a partir de uma causa determinada como, por exemplo, dieta inadequada e inatividade física (GINSBERG, 1990). Desta forma, a utilização de dietas hiperlipídicas pode ser uma forma de se provocar o quadro de dislipidemia, caracterizado por elevações nas concentrações plasmáticas de colesterol total e triacilgliceróis, além de promover alterações em outros tecidos, como o hepático.

Em nosso laboratório, desde 1996, realizamos estudos envolvendo a utilização de dietas hiperlipídicas, a fim de analisar as implicações em diferentes tecidos. Inicialmente, os estudos estavam voltados para os efeitos do infuso da planta *Croton cajucara* Benth, conhecido por possuir propriedades hipocolesterolêmicas. A indução da hipercolesterolemia não foi um processo simples, por isso foi estabelecido um projeto piloto com base na referência de Paigen et al. (1987), que trabalhou com camundongos cuja as concentrações de colesterol estavam significativamente elevadas, após tratamento com dieta hiperlipídica, comparado aqueles que ingeriram a dieta padrão. A partir deste projeto piloto, foram realizadas novas pesquisas com o modelo de indução da hipercolesterolemia, por meio de dieta específica. Nos primeiros trabalhos realizados, o tempo que os ratos fizeram ingestão da dieta hiperlipídica foi de seis semanas. Miotto (2001) identificou que, após este período de ingesta, os ratos apresentaram elevação das concentrações séricas de lipídeos, bem como redução na sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados. Outro trabalho que também foi realizado no laboratório envolveu o tratamento de ratos com dieta hiperlipídica por quatro ou seis semanas (WOLF-NUNES, 2004). Os ratos que foram tratados com dieta hiperlipídica apresentaram elevações significativas das concentrações de colesterol e triglicérides comparados aos ratos que ingeriram a dieta padrão, após quatro semanas ingerindo a dieta hiperlipídica. Neste mesmo período, não foram observadas elevações significativas nas concentrações sanguíneas de glicose. Para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, também verificou-se instalação do quadro de hiperinsulinemia.

Wolf-Nunes (2004) analisou alterações na quantidade do pâncreas adiposo epididimal somente dos ratos que ingeriram a dieta hiperlipídica por seis semanas. Foi observado aumento significativo na quantidade de tecido adiposo, comparado ao grupo controle. O aumento na quantidade desta massa adiposa é decorrente tanto pelo aumento no tamanho dos adipócitos, quanto pela elevação no número de células, que sofrem variações devido a processos intracelulares como a lipólise e a lipogênese (QUEIROZ et al., 2009).

No trabalho realizado por Moreira (2005), foi verificado que a realização do exercício físico, para ratos que realizaram ingesta da dieta hiperlipídica por quatro semanas, impediu que os átrios direitos desenvolvessem subsensibilidade à agonistas adrenérgicos. A utilização de natação impediu que ratos que ingeriram dieta hiperlipídica por quatro semanas, tivessem aumento significativo das concentrações de triacilgliceróis, colesterol total e suas frações:

lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL), comparado ao grupo controle. A natação também impediu alterações vasculares para os ratos hiperlipídicos, que foi verificada para os ratos hiperlipídicos que permaneceram sedentários (ESTRELA, 2007).

Além de estudos com este modelo de dislipidemia induzida por dieta hiperlipídica, o laboratório de estudo do estresse (LABEEST), também vem estudando as respostas metabólicas, vasculares e endócrinas de ratos frente a diferentes agentes estressores como o choque nas patas e a natação (VERAGO; GRASSI-KASSISSE; SPADARI-BRATFISCH, 2001; FARIAS-SILVA et al., 2002; SAMPAIO-BARROS et al., 2003; HATORE, 2006; ESTRELA, 2007; ALMEIDA, 2008) No caso do modelo de natação, diferentes protocolos tem sido testados apresentando variações no tempo de duração e/ou frequência da atividade, bem como na temperatura da água. Estudos mostraram que a utilização da natação em ratos apresenta vantagens sobre o treinamento de corrida (PAPOTI et al., 2003).

O modelo de estresse por choque nas patas foi desenvolvido como forma de estudar os efeitos dos fatores presentes na reação de estresse. Atualmente, sabemos que o estilo de vida estressante está relacionado com aumento do risco de doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos, que podem favorecer a instalação de patologias como a obesidade, Diabetes Mellitus e síndrome metabólica (KAWADA & OKADA, 2006; RAIKKONEN; MATTHEWS; KULLER, 2007; SCHAFER et al., 2007). Pesquisas já realizadas em nosso laboratório mostraram que estes animais, submetidos a três sessões, em dias consecutivos, de choques nas patas tiveram elevação significativa nas concentrações de corticosterona, após cada uma das sessões, enquanto que as concentrações de triglicerídeos plasmáticos tiveram aumento significativo somente após a primeira sessão. Já as concentrações plasmáticas de glicose apresentaram-se elevadas significativamente, após a segunda e terceira sessões de choques nas patas (VERAGO; GRASSI-KASSISSE; SPADARI-BRATFISCH, 2001). Com este mesmo protocolo, também foi demonstrado que os adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal destes ratos, apresentaram maior sensibilidade a isoprenalina e menor efeito lipolítico pela noradrenalina. A expressão dos adrenoreceptores β_1 e β_3 estava reduzida, enquanto que os adrenoreceptores β_2 apresentaram maior expressão, comparado aos adipócitos dos ratos controle. Além disso, foi verificado que os ratos submetidos às sessões de choques nas patas estavam

hiperglicêmicos e hiperinsulinêmicos, sendo que os adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal apresentaram menor sensibilidade aos efeitos antilipolíticos da insulina, sugerindo instalação do quadro de resistência à insulina (FARIAS-SILVA et al., 1999; 2002; 2004). Almeida (2008) também realizou estudos com este modelo de estresse por choque nas patas, e observou que a captação de glicose pelos adipócitos isolados destes ratos estava menos sensível à insulina, enquanto que para a noradrenalina, a captação foi significativamente maior, comparado aos ratos controle. A autora também verificou que a captação de glicose pelos adipócitos isolados é realizada principalmente pelos adrenoceptores α_1 e que os adrenoceptores β_2 destes ratos do grupo choque, quando estimulados, inibiram significativamente a captação de glicose pelos adipócitos, sugerindo uma troca na sinalização intracelular da via Gs para Gi.

As alterações fisiológicas desencadeadas por todos estes modelos estudados em nosso laboratório são bem amplas e acometem diferentes tecidos, como o adiposo, hepático e cardíaco.

Nos últimos anos, o tecido adiposo deixou de ser simplesmente um sítio que controla o estoque de energia no organismo. Diversos estudos mostraram que o tecido adiposo é responsável pela produção de moléculas bioativas, como a leptina, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e outras adipocinas (KERSHAW; FLIER, 2004; ARAI et al., 2011). A descoberta destas novas moléculas produzidas no tecido adiposo fez com que inúmeras pesquisas fossem realizadas buscando a compreensão deste tecido em mecanismos fisiológicos e patológicos, incluindo os processos inflamatórios e imunes (WARNE, 2003; FANTUZZI, 2005; POND, 2005).

Por conta da importância deste tecido, cada vez mais, o papel dos adipócitos em doenças como a síndrome metabólica e a obesidade vem sendo estudado em diversos grupos de pesquisa. Além disso, outras alterações, muitas vezes comuns a estes distúrbios como a hipercolesterolemia e a resistência à insulina, também são alvo de trabalhos científicos. A insulina é um hormônio responsável por garantir a homeostasia da glicose em nosso organismo. A glicose é fonte fundamental para produção de energia pelas células eucariontes. Nos seres humanos, a utilização da glicose é realizada por vários tipos celulares, entretanto, na condição basal, o tecido cerebral é responsável pelo consumo aproximado de 80% do total (BRYANT; GOVERS; JAMES, 2002). Além da importância energética, a glicose pode realizar a regulação da transcrição de genes, atividades enzimáticas e secreção de hormônios (THORENS & MUECKLER, 2010). Após as

refeições, a elevação da glicemia é responsável por liberar a insulina produzida nas células β do pâncreas, que vai estimular a captação de glicose pelos tecidos, tanto para produção de energia ou para armazenamento na forma de glicogênio, neste caso, no tecido hepático e muscular (SALTIEL & KAHN, 2001). No tecido cerebral, temos neurônios sensíveis às concentrações de glicose, que são ativados ou inibidos, quanto verificamos elevação na glicemia. Estas células estão envolvidas com o controle da ingesta alimentar, gasto de energia e homeostasia da glicose (MARTY; DALLAPORTA; THORENS, 2007). A entrada de glicose nas células é um processo complexo, visto que a maioria das células não são naturalmente permeáveis a esta molécula. Para muitos tecidos, é necessário que sejam formados transportadores de glicose para que esta consiga entrar na célula. A existência de múltiplas isoformas destes transportadores, com propriedades cinéticas diferentes e sua expressão na superfície das células, que vai determinar os ajustes finos no processo de captação de glicose (THORENS & MUECKLER, 2010).

Os transportadores de glicose fazem parte de uma família de proteínas, específicas para realizar este transporte, denominadas GLUTs (*Glucose Transporters*). Existem descritos 14 tipos diferentes destas proteínas, sendo que os transportadores da classe I (GLUT-1 a 4) são os mais importantes (SIMPSON et al., 2008). A insulina desempenha papel fundamental neste processo, já que a formação dos transportadores de glicose pode ser dependente da participação deste hormônio. Os tipos de GLUTs presentes em cada tecido são bem variáveis. Nas células musculares e adipócitos encontramos o transportador GLUT-1, cujo funcionamento é independente da presença da insulina. Por outro lado, nestes mesmos tipos de células, temos a presença do GLUT-4 que precisam da insulina para ser produzidos (DUCLUZEAU et al., 2002; STUART et al., 2006). A maior parte da captação de glicose de glicose pelos adipócitos e miócitos é realizada pela estimulação da insulina, formando os GLUT-4. A primeira etapa deste processo é dependente da ligação da insulina em seu receptor. Uma vez ligada, será realizada a fosforilação de uma família de substratos do receptor de insulina (IRS1-4) que estão presentes no citoplasma das células (LAVIOLA et al., 2006; HUANG & CZECH, 2007). Com estes substratos ativos, outras proteínas intracelulares, como fosfatidil inositol 3 quinase (PI3-K), também serão ativadas. A PI3-K catalisa a fosforilação de fosfolipídeos de inositol da membrana, resultando na formação de fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (PI3-3,4,5 P₃). Esta última molécula promove a ativação da proteína quinase dependente de fosfoinositídeo (PKD1), que irá ativar outras proteínas intracelulares: Akt/PKB e PKC atípica. São estas duas proteínas que estimulam a

migração dos GLUT-4 para membrana celular, permitindo que a célula capte glicose (SALTIEL & KAHN, 2001; BRYANT; GOVERS; JAMES, 2002; DUCLUZEAU et al., 2002; HUANG & CZECH, 2007). Inúmeras patologias influenciam esta via de captação de glicose, por isso faz-se necessário estudos buscando esclarecer onde as alterações são instaladas.

Além desta captação de glicose estimulada pela insulina, que é considerada a principal via do organismo, outros estudos demonstraram que a captação de glicose também pode ser desencadeada pelas catecolaminas, que se ligam aos adrenoceptores, representando uma via alternativa para captação da glicose em adipócitos isolados do tecido adiposo branco (NONOGAKI, 2000; SMITH, 2002; NEVZOROVA et al., 2006). Diferente da via de captação de glicose estimulada pela insulina, os adrenoceptores estão associados a proteínas G e são divididos em dois principais tipos α e β , que por sua vez apresentam subdivisões: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3 . Na literatura temos estudos descrevendo a participação, tanto de adrenoceptores beta, quanto do subtipo alfa-1 no processo de captação de glicose pelos adipócitos (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996; 1998; LIU; PERUSSE; BUKOWIECKI, 1998; MORENO-ALIAGA et al., 2002; CHENG et al., 2000). Estudos na literatura mostraram que a captação de glicose via adrenoceptor α_1 está relacionada com a ativação da proteína quinase C (PKC) que aumenta a atividade da PI3-K e, conseqüentemente, estimula a captação de glicose (ZHONG & MINNEMAN, 1999). No caso dos adrenoceptores b, a captação de glicose estimulada por estes receptores, está relacionada com o aumento nas concentrações de AMPc (adenosina monofosfato cíclico), decorrente da quebra de ATP (adenosina trifosfato) (KASHIWAGI & FOLEY, 1982). Desta forma, também é necessário que seja realizada a investigação da influência de condições próximas a verificada em patologias, que podemos induzir a partir da administração de dieta hiperlipídica, no processo de captação de glicose estimulada pelas catecolaminas.

Estudos realizados em Framingham (EUA) a partir de 1948 demonstraram que determinados fatores de risco como valores séricos de colesterol, tabagismo e hipertensão arterial estavam associados à existência de cardiopatia isquêmica (WONG; WILSON; KANNEL, 1991) inaugurando uma nova etapa de estudos sobre as doenças cardiovasculares. Muitos estudos epidemiológicos na literatura também descreveram complicações cardiovasculares associadas à ingestão de dietas hiperlipídicas, mostrando que o quadro de dislipidemia é um fator de risco relacionado com o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardíacas (GRUNDY & BEARN,

1988; MARINETTI, 1990; RUBATTU et al., 1993; WALD & LAW, 1995; DANEV et al., 1997; HOWARD, 1999; HUANG et al., 2004; MITROU et al., 2007; GLAZER et al., 2009).

A ingesta alimentar pode influenciar a atividade do sistema nervoso simpático (SNS), como por exemplo, quando é realizado um consumo excessivo de lipídios e carboidratos (CRANDALL et al., 1983; KAUFMAN; PETERSON; SMITH, 1991; DANEV et al., 1997). O tônus simpático cronicamente aumentado, por sua vez, resulta em elevação da frequência cardíaca e/ou da pressão arterial.

Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que ratos que ingeriram dieta hiperlipídica por seis semanas apresentaram instalação do quadro de dislipidemia, que resultou em aumento significativo da pressão arterial sistólica, diastólica e média destes animais, comparado aqueles que fizeram ingesta da dieta padrão, além de elevado índice aterogênico e aumento significativo da frequência cardíaca, bem como desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (MIOTTO, 2006). Este trabalho, juntamente com o de Wolf-Nunes (2004), que trabalhou com ratos que fizeram ingesta de dieta hiperlipídica por quatro ou seis semanas, terão parte dos dados apresentados posteriormente.

Considerando informações e resultados que foram obtidos previamente em outras pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório (LABEEST), a continuidade de estudos com modelos já estabelecidos em nosso grupo e a comparação de resultados entre estes modelos é uma forma de contribuir para o esclarecimento do desenvolvimento de como cardiopatias e alterações metabólicas são instaladas nestes modelos e, desta forma a síndrome metabólica, que acomete muitas pessoas, atualmente.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar as alterações metabólicas e cardiovasculares em ratos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica por quatro semanas e comparar estas alterações com outros modelos estudados no laboratório.

Objetivos específicos

Avaliar os parâmetros metabólicos:

Ensaio *in vivo*:

- O ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico.

Ensaio realizados *in vitro*:

- Captação de glicose basal e estimulada em adipócitos isolados;
- Produção de lactato basal e estimulada em adipócitos isolados;
- Produção de glicerol basal e estimulada em adipócitos isolados;
- Análise morfométrica de adipócitos.

Avaliar os parâmetros cardíacos:

Ensaio *in vivo*:

- Registro eletrocardiográfico em ratos anestesiados.

Ensaio *in vivo*:

- Análise histológica do coração e de cardiomiócitos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, Albina, Rodentia, Mammalia), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com idade de quatro semanas, que, em seguida, passaram por duas semanas de adaptação no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Após este período, os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (seis animais por gaiola), durante quatro semanas, com a temperatura média de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12:00 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 6:30 horas. Durante os experimentos, os ratos foram tratados de acordo com as normas descritas por Olfert et al., (1993) para uso de animais para pesquisa e educação.

Os experimentos foram realizados em concordância com os princípios para uso de animais em pesquisa e educação adotados pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia (Protocolo inicial: 058-1, modificado posteriormente para 2561-1; UNICAMP) (ANEXO-1).

3.2 Grupos e dieta

Os ratos do grupo controle foram alimentados com uma ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Labina-Purina, Brasil (<http://sogorb.com.br/01-08-01.html>) - ratos normolipidêmicos. Outros animais foram alimentados com ração hiperlipídica contendo 15% de gordura de manteiga de cacau, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (ratos hiperlipidêmicos) durante quatro semanas (WOLF-NUNES, et al., 2000; MIOTTO, 2001; WOLF-NUNES, 2004).

Os ratos foram então, subdivididos em dois grupos: Dieta e controle, e permaneceram sedentários. A água foi oferecida diariamente *ad libitum* e, a cada dois dias, foi fornecido 500 g de ração.

Composição da dieta hiperlipídica	
Ingredientes	Quantidade (%)
Carboidratos	26,8
Proteínas	27,9
Lipídeos	35,25
Fibras	5,0
L-cistina	0,3
Minerais	3,5
Vitaminas	1,0
Colina	0,25
TOTAL	100

Tabela 1: Composição da dieta hiperlipídica. Fonte: HN&C Consultoria em Nutrição Experimental (CNPJ 10.427.871/0001-40). A fração de carboidratos foi composta por amido (63,06%), sacarose (16,05%) e dextrina (20,89%). A fonte de proteína utilizada foi caseína comercial. A fração lipídica utilizada foi a banha de porco. As misturas de vitaminas e minerais foram formuladas de acordo com AIN-93 (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Densidade calórica = 5,36 cal/g.

3.3 Controle da evolução ponderal e consumo de ração

Durante as quatro semanas que os ratos permaneceram em tratamento com dieta padrão ou hiperlipídica, foram avaliados o peso corporal e a quantidade de consumo de ração. Este controle foi realizado três vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras), sempre no período entre 16 e 17 horas.

3.4 Coleta de sangue e análise das concentrações plasmáticas e sanguíneas

Após jejum de 16 horas, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg /Kg. i.p.; Hypnol, Fontoveter, Itapira, SP, Brasil) e foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca extraindo 5 mL de sangue do animal para determinação do perfil lipídico. Colesterol total e triacilgliceróis (TAG) foram determinados colorimetricamente usando *kits* diagnósticos comerciais (Laborlab, Barueri, SP, Brasil).

Para a determinação das concentrações sanguíneas de glicose foi realizado um corte na ponta do rabo do animal para coleta de sangue. As concentrações de glicose foram determinadas utilizando-se as fitas Glucocard Test Strip II, submetidas à leitura em glicosímetro (Super Glucocard II, ARKRAY FACTORY Inc., Kouka-Gun, Shiga, Japão).

3.5 Cateterização arterial e venosa

Os ratos foram anestesiados com Ketamina (Cloridrato de Cetamina, 50 mg/Kg de peso corporal, i.m.) e Rumpum (Cloridrato de Xilazina 0,01 mg/Kg de peso corporal, i.m.), segundo o protocolo de Ueno et al. (2005). Após a anestesia, foi realizada a cateterização da veia jugular direita e a artéria carótida esquerda, para coleta das amostras de sangue. Os cateteres de polietileno (PE10 e PE50) foram previamente siliconizados e preenchidos com solução de citrato de sódio, 5 mM em salina (NaCl 0,9% m/v). As cânulas foram expostas na região ventral do animal (VERAGO et al., 2001; FARIAS-SILVA et al., 2002; MARTINELLI, 2009).

3.6 *Clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico

Após uma hora da realização do procedimento cirúrgico, foram implantadas extensões dos cateteres para facilitar a manipulação e o *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico foi iniciado. No cateter venoso foi implantado um sistema “T” para realizar a perfusão simultânea das seguintes soluções:

- Solução de insulina de cerca de 6 μ U/Kg.min diluída em NaCl 0,9% adicionado de 1% de BSA, com auxílio de uma bomba de infusão em velocidade constante;
- Solução de glicose (10%) com auxílio de uma bomba peristáltica.

Alíquotas de 10 μ L de sangue foram coletadas a cada 10 minutos, durante duas horas, para determinação da glicemia através de um analisador de glicose, glicosímetro (ACCU CHEK Go, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). O tempo zero para início deste prazo de duas horas foi obtido após a estabilização da glicemia próximo dos valores de jejum, verificado em três medidas consecutivas.

O débito de perfusão de glicose foi realizado de tal forma que a glicemia ficasse mantida em 6 mM. Os resultados foram expressos com a quantidade de glicose perfundida para manter a euglicemia (mg/Kg.min) durante as duas horas de *clamp*, um índice de utilização total de glicose pelo organismo inteiro (AGOSTO et al., 1997; BARET et al., 2002).

3.7 Isolamento de adipócitos

Os adipócitos foram isolados do tecido adiposo epididimal, por uma modificação no procedimento original de Rodbell (1964). O tecido adiposo foi pesado, picado e digerido em tubo de polietileno (20 mL) contendo 10 mL de tampão Krebs Ringer bicarbonato, 25 mM HEPES, 6 mM glicose, pH 7,4 (Tampão KRB) com a adição de 1 mg/mL de colagenase (tipo 2, *Clostridium histoliticum*) e 3% albumina sérica bovina (BSA, fração V, livre de ácidos graxos; KRBA). O tubo foi agitado em 40 ciclos/min. a 37°C durante 45 minutos. A suspensão celular resultante foi filtrada através de uma malha de nylon (200 μ M) e lavada três vezes com tampão fresco KRBA. Uma alíquota da suspensão celular final foi contada em câmara Mallassez para ajuste da concentração de células em 100.000 ou 300.000, que foi variável de acordo com o protocolo a ser utilizado (FAINTRENIE & GÉLÖEN, 1998).

3.8 Captação de glicose pelo tecido adiposo

Esta metodologia foi baseada naquela desenvolvida por Faintrenie & Gélöen (1998) com pequenas modificações. Adipócitos epididimais (300.000 células) foram pré-incubados em tubos de polietileno com tampão KRBA contendo diferentes concentrações de noradrenalina (0,1 nM a 1000 nM), isoprenalina (1000 nM) ou insulina (50 μ U/mL a 500 μ U/mL). A incubação foi feita a 37°C, sob agitação de 40 ciclos por minuto, durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados

10 μL de KRBA (37°C) contendo 0,2 μCi de 2-[1,2- ^3H]-desoxiglicose (2-DG). Após 15 minutos de incubação (37°C , 40 ciclos por minuto) a captação de glicose foi interrompida com a adição de 1 mL de KR-HEPES gelado. A suspensão de células foi imediatamente filtrada em filtro de nitro celulose (8 μM), preso a um aparato de filtração (Millipore, Indústria e Comércio Ltda, SP, BR). Os filtros foram lavados três vezes com 1 mL de solução de KR-HEPES gelado. Em seguida, os filtros foram colocados em *vials* apropriados para adicionarmos 5 mL de líquido de cintilação (Packard Bioscience, Me, USA). Os *vials* foram vigorosamente agitados (150 ciclos/min) até completa dissolução do filtro e em seguida, foram colocados em um contador de cintilação (Beckman Instruments, Palo Alto, CA).

A captação basal de glicose foi avaliada em um recipiente contendo também 300.000 células que seguiram todas as etapas, na ausência agonista (FAINTRENIE & GÉLÖEN, 1998). Os resultados foram expressos em porcentagem de captação em relação ao basal em 15 minutos de incubação / 3×10^5 células, de experimentos realizados em quadruplicata.

3.9 Estudo farmacológico

Neste ensaio trabalhamos com 100.000 células em volume final de 1 mL. As células foram incubadas com agonistas seletivos ou não: noradrenalina de 0,01 nM a 1000 nM (agonista α e β adrenérgico); isoprenalina de 0,01 nM a 1000 nM (agonista β adrenérgico) (GELLAI & RUFFOLO, 1987) e, quando necessário, utilizamos também antagonistas: Propanolol, 1000 nM, (antagonista β adrenérgico) ; ICI 118,551, 50 nM, (antagonista β_2 adrenérgico). Os adipócitos foram pré-incubados na presença ou não de antagonistas a 37°C durante 15 minutos (60 ciclos/minuto), após esse período os agonistas foram adicionados à suspensão celular e então incubados por mais 60 minutos a 37°C (60 ciclos/minuto). A reação foi finalizada após esse período colocando as amostras no gelo. As células foram retiradas do meio de incubação através de aspiração e o infranadante foi imediatamente congelado e armazenado a -20°C para posterior análise da concentração de glicerol e lactato.

3.10 Dosagem de 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 (H_2O_2) pela lactato oxidase. Na presença do H_2O_2 formado, a peroxidase catalisa a oxidação de um precursor cromogênico que produz a coloração.

Alíquotas de 10 μ L do conteúdo liberado nos eppendorfs foram pipetadas dentro de *wells* de uma placa de Elisa e após a reação com o reativo de trabalho do *kit* foi feita a leitura da concentração de lactato através de um leitor de Elisa em comprimento de onda de 540 nm (CREGE, 2007).

3.11 Dosagem de glicerol no meio de incubação

O glicerol produzido nas incubações foi medido através de reações catalisadas pelas enzimas glicerol quinase, glicerol fosfato oxidase e peroxidase (através do *kit* de leitura de triglicerídeos da Laborlab, SP, Brasil).

O glicerol é fosforilado pela adenosina trifosfato (ATP) formando glicerol-1-fosfato e ADP, nesta 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.

Alíquotas de 10 μ L do conteúdo liberado nos eppendorfs foram pipetadas dentro de *wells* de uma placa de Elisa e após a reação com o reativo de trabalho do *kit* foi feita a leitura da concentração de glicerol através de um leitor de Elisa em comprimento de onda de 540 nm (CREGE, 2007). A concentração de glicerol no meio de incubação foi expressa em μ mol de glicerol em 10^6 células/ 60 minutos.

3.12 Análise morfológica dos adipócitos

A análise morfológica dos adipócitos foi realizada de acordo Pinheiro & Grassi-Kassisse (2007). Após colocar a alíquota da suspensão celular na câmara de Mallassez, conforme descrito acima, foram capturadas quatro imagens através do microscópio Leica (área analisada de 632 mm) e, para todas as células presentes no campo, foi determinado o diâmetro e área, utilizando o *software Image Pro Plus v 3.0* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

3.13 Parâmetros eletrocardiográficos

O eletrocardiograma (ECG) foi realizado em eletrocardiógrafo computadorizado, modelo Heart Ware, com os animais sob anestesia. Os eletrodos, em forma de agulha, foram fixados subcutaneamente nas quatro posições convencionais, nos membros estendidos com os animais na posição supina. Os registros foram realizados nas derivações bipolares (DI, DII e DIII) e amplificadas (aVR, aVL e aVF), com velocidade 50mm/segundo e sensibilidade 2N. Foram determinadas a frequência cardíaca, a amplitude e duração das ondas e duração dos intervalos e segmentos eletrocardiográficos. (COSTA et al. 2008; HENKENS et al. 2007; HENKENS et al. 2008).

3.14 Histologia cardíaca

Para analisarmos o tecido cardíaco, inicialmente, foi induzida a parada cardíaca com solução de KCl. Logo após a parada, o coração foi retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução salina. Realizou-se então a separação dos átrios, e os ventrículos foram pesados e colocados em solução de Bouin por 72 horas. Em seguida, cada órgão foi lavado sucessivamente em solução contendo tampão fosfato e salina e desidratados com álcool 70% durante 16 horas.

Após esta passagem, seguiu-se desidratação com álcool 80% (1 hora), álcool 95% (1 hora), quatro passagens por álcool 100% (30 minutos cada passagem) e álcool 100% + xilol (1:1) por 30 minutos em estufa. Em seguida, os tecidos foram transferidos para forma contendo

parafina, permanecendo em estufa por três horas. Após resfriamento, cada bloco foi retirado das formas e o excesso de parafina removido.

Os cortes histológicos foram realizados com micrótomo e fixados em lâminas com albumina. Após a fixação em lâminas, os cortes foram corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE) e pelo Tricômio de Masson. Foram obtidas imagens das lâminas no microscópio Leica (40x e 100x), para análise da espessura da parede ventricular e do diâmetro da câmara, utilizando-se o *software* Image Pro Plus Analyser.

3.15 Análise dos resultados

Todos os resultados foram expressos como médias \pm EPM (Erro Padrão da Média), a partir de valores individuais. Os valores foram analisados através de teste *t* de Student, para comparar dois grupos experimentais, e ANOVA seguida do teste de Tukey, quando comparado mais de dois grupos experimentais, usando o *software* Prisma (GraphPad Software Inc., USA) (VERAGO et al., 2001; FARIAS-SILVA et al., 2002; SAMPAIO-BARROS et al., 2003).

As áreas sob as curvas (AUC) obtidas no *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico foram realizadas pelo método trapezoidal através do *software* Prisma e em seguida analisadas utilizando o teste *t* de Student. (BARET et al., 2002; MARTINELLI, 2009).

As diferenças foram consideradas significativas quando os valores de *p* foram menores que 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados será iniciada pelas alterações metabólicas que foram encontradas nos ratos que fizeram a ingesta da dieta hiperlipídica por quatro semanas, comparando com os ratos controle e com outros modelos já estabelecidos no laboratório. Em seguida, serão discutidos os resultados dos parâmetros cardiovasculares que foram analisados nestes ratos.

Evolução ponderal e ingesta alimentar

Os animais utilizados neste estudo chegaram ao biotério com quatro semanas e, após duas semanas de adaptação foram designados como pertencentes ao grupo controle ou dieta. Durante quatro semanas, os animais do grupo controle ingeriram a dieta padrão, enquanto que o grupo dieta foi submetido ao tratamento com ração hiperlipídica pelo mesmo período. O peso inicial médio dos animais ao iniciar o tratamento foi de $240,65 \pm 7,71$ g (n=22).

Após completar o período de quatro semanas com ingesta da dieta hiperlipídica, foi verificado o peso final dos animais pertencentes a cada grupo. Os resultados mostraram que o grupo que consumiu a dieta hiperlipídica apresentou peso corporal significativamente maior que os animais do grupo controle (Figura 1). Estes resultados também foram observados em outros trabalhos realizados previamente em nosso laboratório (WOLF-NUNES, 2004; MIOTTO, 2006).

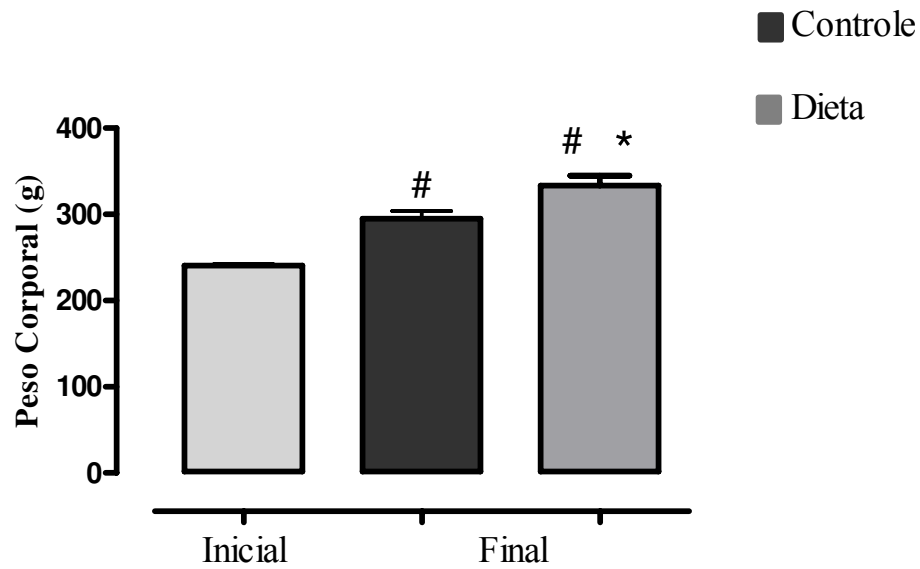


Figura 1. Média do peso final dos animais pertencentes aos grupos controle (n=11) e dieta (n=9), comparado a média do peso corporal inicial, considerando os dois grupos (n=20). A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ Dieta vs. Controle. # $p < 0,05$ Peso Final vs. Peso Inicial.

Da sexta a décima semana de vida foi realizado o controle da ingesta alimentar dos animais pertencentes a ambos os grupos. A ingesta inicial durante as duas primeiras semanas de adaptação no biotério, com dieta padrão para todos os animais, apresentou valor médio de $18,8 \pm 1,68$ g.

Quando analisamos a média do consumo de ração na última semana de tratamento com dieta padrão ou hiperlipídica, (Figura 2), observamos que os animais do grupo dieta apresentaram menor ingesta, estatisticamente significativa, comparado aos ratos pertencentes ao grupo controle. Possivelmente, os motivos para esta ingesta reduzida no grupo tratado com a dieta hiperlipídica é o alto teor lipídico presente na ração que estimula receptores no duodeno, que sinalizam no cérebro a sensação de saciedade, ainda no período pré-absortivo, promovendo maior saciedade com menor quantidade de ração (GREENBERG et al., 1990). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos da literatura que demonstraram diminuição da ingesta alimentar quando submetidos à administração intraduodenal de lipídeos (GREENBERG et al., 1990; CARLSON, 2002). Os autores indicam estímulo da saciedade com dietas ricas em lipídeos.

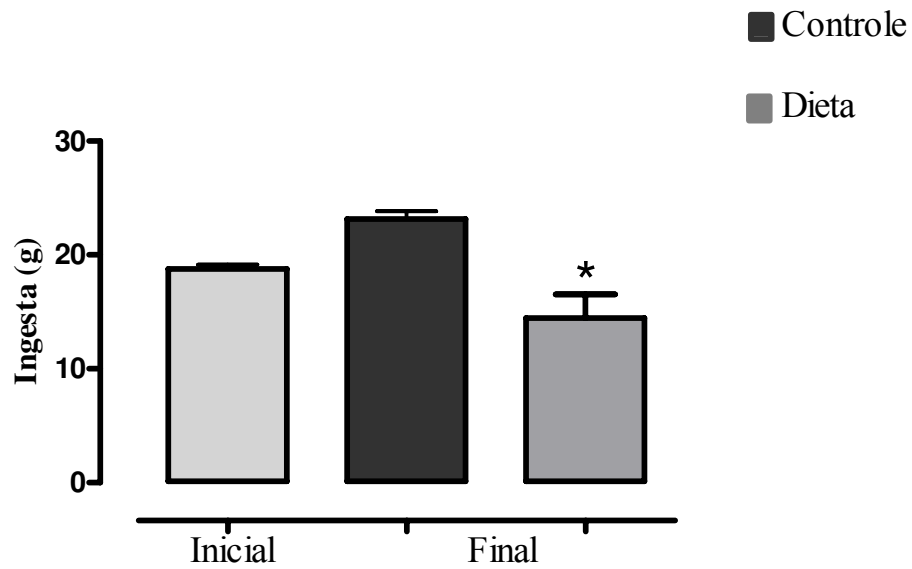


Figura 2. Média do consumo de ração na última semana de tratamento com dieta padrão (n=11) ou hiperlipídica (n=9), comparado a média da ingesta inicial, considerando os dois grupos (n=20). A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ Dieta vs. Controle.

No estudo de Wolf-Nunes (2004), além da análise da quantidade de ração ingerida, também foi verificado o consumo calórico dos animais. A ração hiperlipídica possui 5 Kcal/g, enquanto para a ração padrão esta quantidade é de 4 Kcal/g. Considerando estes valores, identificamos que os animais do grupo submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica tiveram um consumo calórico significativamente menor que os animais alimentados com a ração padrão (D: $72,35 \pm 10,37$ vs. C: $92,6 \pm 9,19$ g, $p < 0,05$).

O controle da ingesta alimentar é um processo extremamente complexo que envolve a participação de diversas áreas do Sistema Nervoso Central (SNC), que modulam o balanço energético, por meio da regulação da ingesta e do gasto energético, em resposta a hormônios, bem como através de sinais neurais ou nutricionais (SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2011; DIÉGUEZ et al., 2011)

Outros estudos recentes mostraram que algumas vias do SNC estão ligadas ao tecido adiposo branco e marrom, bem como o fígado, e desta forma acabam influenciando diretamente o metabolismo dos adipócitos e hepático (KREIER et al. 2006; NOGUEIRAS; LOPEZ; DIÉGUEZ et al., 2010).

Diversas moléculas estão envolvidas com o controle da ingesta alimentar. A região do hipotálamo é uma das mais estudadas e apresentam dois grupos de neurônios que com efeitos opostos na ingesta alimentar. Alguns neurônios expressam neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao agouti (AgRP) que estimulam a ingesta alimentar, enquanto que outros neurônios expressam a pró-ópio-melanocortina (POMC) e o fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente (CART), cujo efeito é inibir a ingesta alimentar (SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2011).

A liberação destes fatores hipotalâmicos é regulada por aferências vagais e por diversos hormônios (BAILEY, 2008). Existem mais de 30 genes de hormônios que podem ser expressos e mais de 100 peptídeos distribuídos no trato gastrointestinal, o que faz desta região o principal órgão endócrino do organismo (REHFELD, 1998).

Uma das descobertas mais importantes no final do século passado foi a clonagem do gene *ob*, em 1994, por Friedman e colaboradores. O gene *ob* é responsável por expressar a leptina, que é um hormônio secretado pelo tecido adiposo branco e sua concentração sanguínea está

intimamente relacionada com o controle da massa corporal (FREDERICH et al., 1995). Além disso, outros estudos mostram que a leptina pode influenciar diversos aspectos do comportamento alimentar, que incluem o tamanho da refeição e a preferência alimentar (KAHLER et al., 1998; LICINIO, 2007; GAUTRON & ELMQUIST, 2011).

No trabalho de Wolf-Nunes (2004), as concentrações circulantes de leptina dos ratos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica foram determinadas, sendo que, para estes animais, não foram observadas diferenças significativas comparado ao controle, mesmo havendo aumento no peso dos panículos adiposos das regiões epididimal e peri-renal.

Isto também foi observado no trabalho de Haluzik e colaboradores (2000), não identificaram diferenças significativas entre as concentrações séricas de leptina em indivíduos hiperlipidêmicos eutróficos.

Análises Plasmáticas e Sanguíneas

Com o intuito de analisar as alterações metabólicas induzidas pelo tratamento com a dieta hiperlipídica, dentre os experimentos realizados, foram determinadas as concentrações plasmáticas de colesterol e triacilgliceróis, além das concentrações sanguíneas de glicose.

A concentração total de colesterol dos animais que fizeram a ingesta da ração padrão foi igual a $42,32 \pm 3,93$ mg/dL enquanto que para os animais do grupo tratados com a dieta hiperlipídica, os valores foram significativamente maiores $71,91 \pm 6,46$ mg/dL (Figura 3). Estes resultados estão de acordo com o trabalho realizado em nosso laboratório por Miotto (2006), que utilizou a mesma dieta, por um período de seis semanas e com o trabalho de Wolf-Nunes (2004), após quatro semanas de tratamento com a dieta hiperlipídica.

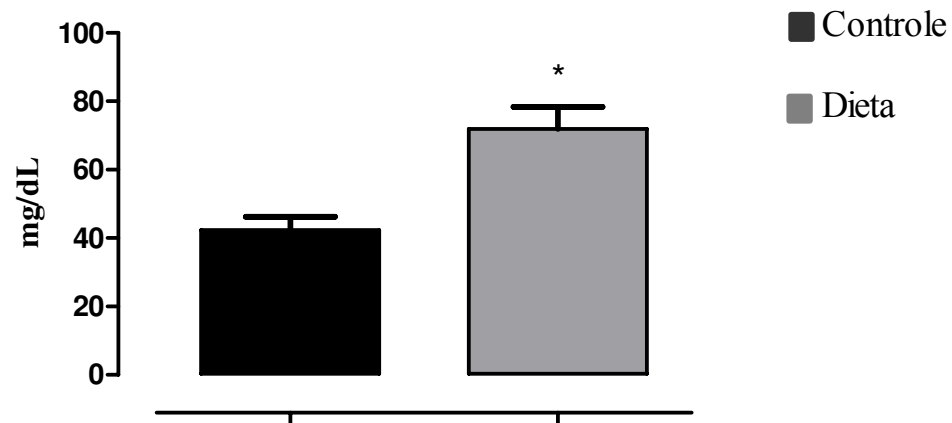


Figura 3. Concentração de colesterol plasmático (mg/dL) dos animais do grupo controle (n=11) e tratados com dieta hiperlipídica (n=15). Os valores estão expressos em média \pm EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ Controle vs. Dieta.

As concentrações plasmáticas dos triacilgliceróis, por sua vez, não apresentaram diferenças significativas entre os animais do grupo controle e dieta ($C = 21,6 \pm 2,8$ mg/dL vs. $D = 24,1 \pm 3,8$ mg/dL) (Figura 4). Estes dados são diferentes do que foi observado nos trabalhos de Wolf-Nunes (2004) e Miotto (2006). Ambos os autores encontraram diferenças estatisticamente significativas, quando compararam as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis. No trabalho de Wolf-Nunes (2004), após quatro semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, as concentrações de triacilgliceróis foram: $C = 23,8 \pm 2,3$ mg/dL vs. $D = 37,6 \pm 2,1$ mg/dL, $p < 0,05$. Já Miotto (2006), após as seis semanas de tratamento com a dieta hiperlipídica, encontrou os seguintes valores: $C = 20,9 \pm 1,2$ mg/dL vs. $D = 51,3 \pm 1,7$ mg/dL, $p < 0,05$.

Uma das prováveis diferenças neste resultado pode estar relacionada com o método utilizado para dosagem destas concentrações plasmáticas dos triacilgliceróis. Miotto (2006) realizou a coleta de sangue de ratos que foram cateterizados previamente, não utilizando anestésico, que foi utilizada para os ratos analisados neste estudo. Já no trabalho de Wolf-Nunes (2004), a análise das concentrações dos triacilgliceróis foi determinada em amostras de sangue coletadas em seringa não heparinizada, enquanto que para os ratos do presente estudo foi utilizada seringa contendo anticoagulante. Outra possibilidade são os tipos de fibras que compõem a ração hiperlipídica utilizada e que podem ser diferentes da ração que foi empregada nos dois trabalhos anteriores.

Embora estes valores tenham variado entre os trabalhos descritos acima, as concentrações elevadas de colesterol, bem como a avaliação morfológica do tecido hepático, realizada em outro estudo de nosso laboratório ainda não publicado, indicou esteatose hepática nos ratos que ingeriram a dieta hiperlipídica por quatro semanas (Figura 5). A esteatose hepática é atualmente reconhecida com o a manifestação hepática da síndrome metabólica, e é a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada com o fígado. Fatores de risco associados à esteatose hepática incluem obesidade e resistência à insulina. O prognóstico da doença está relacionado com o grau de esteatose, podendo evoluir no longo prazo para cirrose hepática. Por conta da presença de esteatose hepática, podemos inferir que tivemos instalação do quadro de dislipidemia (HJELKREM; TORRES; HARRISON, 2008).

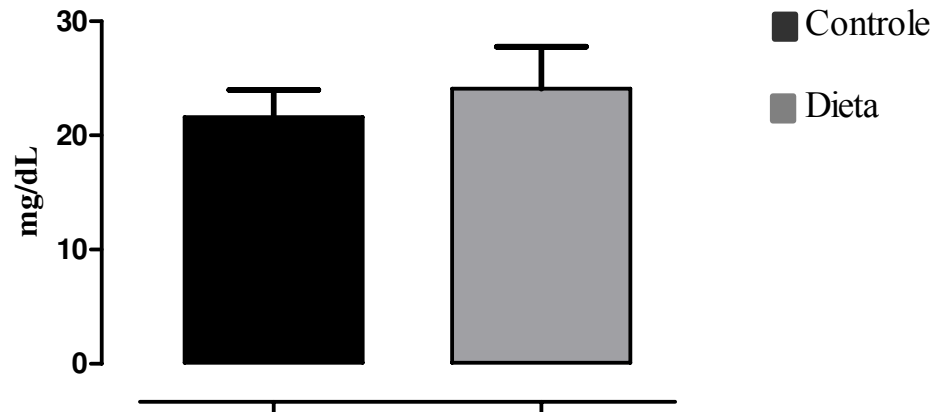


Figura 4. Concentrações plasmáticas de triacilgliceróis (mg/dL) dos animais do grupo controle (n=11) e tratados com dieta hiperlipídica (n=15). Os valores estão expressos em média \pm EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$.

A



B

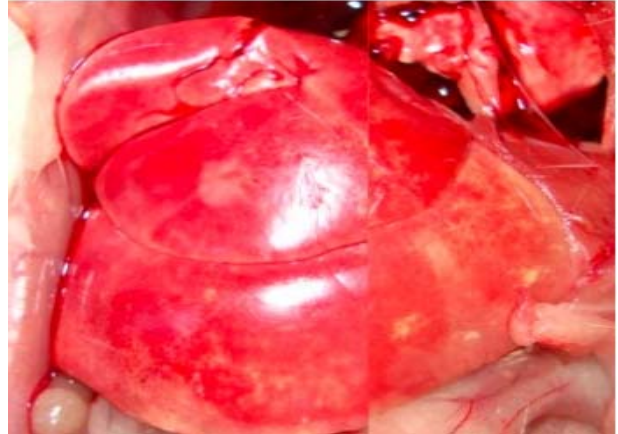


Figura 5: Foto ilustrativa do tecido hepático de ratos controle (A) e submetidos à dieta hiperlipídica (B), ao longo de quatro semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol - Nuvilab Brasil, e a ração hiperlipídica tinha a seguinte composição: 15% de gordura de manteiga de cacau, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (HN&C Consultoria em Nutrição Experimental, Brasil).

A concentração sanguínea de glicose ($C = 83,43 \pm 5,90$ vs. $D = 87,72 \pm 2,93$ mg/dL) não foi significativamente diferente entre os animais tratados com a dieta hiperlipídica ou padrão. Este resultado está demonstrado na figura 6.

No caso das concentrações sanguíneas de glicose, os resultados estão de acordo com o trabalho de Wolf-Nunes (2004), que apesar de ter utilizado outro método para determinação da concentração de glicose, também não encontrou diferenças significativas entre os grupos controle e tratados com a dieta hiperlipídica ($C = 104,2 \pm 4,8$ vs. $D = 99,6 \pm 5,1$ mg/dL). O mesmo resultado foi encontrado por Miotto (2006), que utilizou a dieta hiperlipídica por seis semanas ($C = 112,9 \pm 11,9$ vs. $D = 110,5 \pm 4,9$ mg/dL).

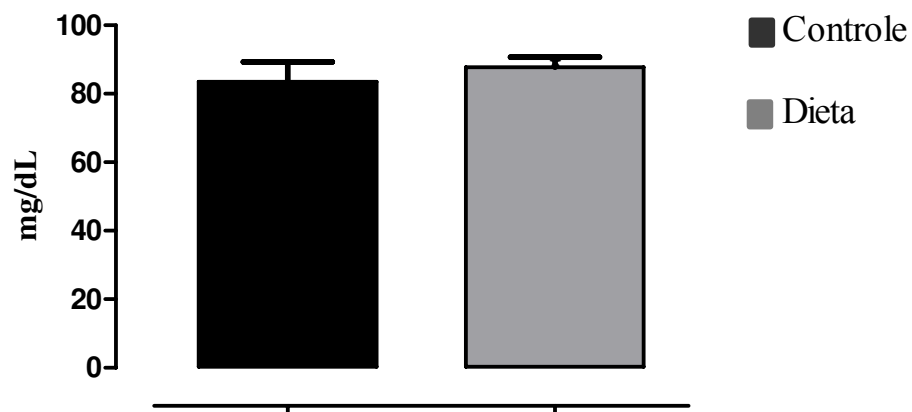


Figura 6. Concentrações sanguíneas de glicose (mg/dL) dos animais do grupo controle (n=7) e tratados com dieta hiperlipídica (n=11). Os valores estão expressos em média \pm EPM. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$.

Clamp Euglicêmico-Hiperinsulinêmico

O *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico foi realizado com o objetivo de analisar o metabolismo glicêmico dos animais e é caracterizado pela manutenção constante de uma taxa de insulina, enquanto que a infusão de glicose é regulada momento a momento (MARTINELLI, 2009). A manutenção da euglicemia por duas horas permite avaliar se houve alteração na captação de glicose pelos tecidos periféricos. Quanto maior a resistência dos tecidos à insulina menor será a taxa de infusão de glicose (AGOSTO et al., 1997).

Em nosso laboratório, dois protocolos diferentes de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico já foram utilizados para realização destes ensaios. Em 2006, o protocolo utilizado consistia na realização do *clamp* após 24 horas do procedimento cirúrgico de cateterização (MIOTTO, 2006). No outro protocolo desenvolvido em 2008, após a cirurgia, as cânulas eram expostas na região ventral do animal e cerca de 1 hora depois o *clamp* era iniciado (MARTINELLI, 2009). Estas alterações foram realizadas com o intuito de aprimorar os experimentos e os resultados foram mais precisos, de forma que, atualmente, o protocolo desenvolvido em 2008 é o que está sendo utilizado nos trabalhos do laboratório.

Nossos resultados, utilizando o protocolo de Martinelli (2009) mostraram que os animais submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica apresentaram taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) significativamente menores que os animais que fizeram a ingesta da dieta padrão tanto na primeira hora ($C = 7,98 \pm 0,07$ vs. $D = 5,00 \pm 0,15$ mg/Kg/min, $p < 0,05$) quanto na segunda hora ($C = 7,67 \pm 0,04$ vs. $D = 3,73 \pm 0,12$ mg/Kg/min, $p < 0,05$). A análise da área sob a curva, considerando às duas horas do *clamp*, também confirmou esta redução na taxa de infusão de glicose ($C = 938,3 \pm 72,06$ vs. $D = 529,6 \pm 58,14$, mg/Kg/min, $p < 0,05$). Durante todo o período de experimento foi observada a euglicemia, o que confere confiabilidade nos dados. Os resultados estão apresentados na tabela 2 e figura 7.

Estes resultados diferem daqueles encontrados por Miotto (2006), que não verificou diferenças significativas na taxa de infusão de glicose na primeira hora e, para os animais tratados com dieta hiperlipídica por seis semanas, na segunda hora, foi verificado aumento significativo

na taxa de infusão de glicose, comparada a taxa de infusão dos animais que ingeriram a dieta padrão.

O protocolo utilizado no trabalho de Miotto (2006) foi o primeiro realizado em nosso laboratório e pode ser um dos motivos das diferenças encontradas. Outro ponto importante é o fato de que o *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico deste trabalho foi realizado com os animais acordados, o que também pode interferir nos resultados devido ao menor controle do experimento. A taxa de infusão de glicose no trabalho de Miotto (2006) apresentou valores elevados, tanto para o controle, quanto para os ratos hiperlipidêmicos, quando comparado com os nossos resultados, obtidos em ratos anestesiados. Baret e colaboradores (2002) também realizaram o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico com os ratos acordados, e encontraram valores elevados comparados aos deste trabalho.

A taxa de infusão de glicose reduzida nos animais submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica durante quatro semanas corrobora com outros trabalhos da literatura que, utilizando técnicas distintas, mostraram menor captação de glicose para animais alimentados com este tipo de ração (HAN et al. 1997; PROIETTO et al., 1999; KADOWAKI et al., 2003; ZHANG et al., 2007; BROWN et al., 2010; HONORS; HARGRAVE; KINZIG, 2011). Kusunoki et al. (2002), realizou experimentos com ratos submetidos a tratamento com dieta hiperlipídica e verificou redução significativa na GIR destes animais, quando comparados ao controle. Outro trabalho, realizado com camundongos, mostrou que após cinco semanas de tratamento com dieta hiperlipídica os animais desenvolvem resistência à insulina e quando tratados com GABA apresentaram melhora na tolerância a glicose e sensibilidade à insulina (TIAN et al., 2011). Ratos da linhagem Sprague Dawley também apresentaram resistência à insulina após o tratamento com seis semanas de dieta hiperlipídica comparado aos animais que fizeram ingesta da dieta padrão (YAO; ZHI; MINHU, 2011).

Diversas doenças metabólicas têm a resistência à insulina como fator desencadeante. A insulina apresenta efeito lipogênico no tecido adiposo, além de estimular no catabolismo das micelas e da fração de VLDL, bem como favorecer o *clearance* da fração LDL (DeFRONZO & FERRARINNINI, 1991; MALMINIEMI et al., 1995).

No trabalho de Kusunoki et al. (2002), foi sugerido que a redução na sensibilidade a insulina é responsável por promover um aumento nas concentrações sanguíneas de VLDL e LDL e efeitos em menor escala nas concentrações de HDL.

Apesar de neste estudo não verificarmos aumento significativo das concentrações de triacilgliceróis dos animais tratados com a dieta hiperlipídica, sabe-se que o aumento de sua quantidade no organismo é capaz de interferir no funcionamento da insulina, reduzindo seu efeito na musculatura (BERGMAN & ADER, 2000). No estudo de Wolf-Nunes (2004), após seis semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, foi verificada elevação significativa, nas concentrações plasmáticas de insulina destes animais, comparado aos ratos que ingeriram a dieta padrão.

A resistência à insulina apresentada pelos animais tratados com dieta hiperlipídica também foi verificada na captação de 2-D-[2,6-³H] deoxiglicose (2-DG) em adipócitos isolados do tecido epididimal, para algumas concentrações de noradrenalina, isoprenalina e insulina, que serão mostradas adiante. No trabalho de Randle (1963), esta menor captação de glicose é atribuída a um aumento na disponibilidade de ácidos graxos, causada pela ingestão da dieta hiperlipídica, fazendo com que este substrato seja mais utilizado em processos metabólicos, reduzindo a captação da glicose.

Em nosso laboratório também são realizadas pesquisas envolvendo a indução de estresse por choque nas patas. Farias-Silva et al. (2002) demonstraram que estes animais, após três sessões de choque, apresentavam hiperglicemia e hiperinsulinemia. Assim como aconteceu com os animais tratados com a dieta hiperlipídica, os ratos submetidos ao estresse por choque nas patas apresentaram redução na captação de 2-DG na presença de insulina (ALMEIDA, 2008).

Esta resistência à insulina é característica em diabéticos do tipo II, que apresentam elevação na glicemia, devida esta menor sensibilidade à insulina tanto em tecidos musculares, quanto no tecido adiposo (STALLKNECHT et al., 1993; KADOWAKI et al., 2003; ZHANG et al., 2010).

Uma das formas descritas na literatura para melhorar a resistência à insulina é a realização de exercícios físicos aeróbios e resistidos (IVY, 1997; WALLBERG-HENRIKSSON; RINCON; ZIERATH, 1998; IVY, 2004; SUNDELL, 2011). Em outro trabalho realizado em nosso laboratório, analisamos os efeitos da realização de 50 minutos de natação, durante cinco dias por semana, ao longo de quatro semanas, em ratos Wistar (MARTINELLI, 2009). Quando analisamos os resultados do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico destes animais submetidos à prática de natação, foi verificado que estes apresentaram maior taxa de infusão de glicose,

comparada ao grupo controle, o que está de acordo com achados da literatura. A sensibilidade periférica de ratos Wistar obesos, por indução de dieta hiperlipídica, melhorou após seis semanas de treinamento resistido (PANVELOSKI-COSTA et al., 2011). Suh et al. (2011) realizou uma pesquisa com adolescentes que praticaram exercício aeróbio ou resistido por 12 semanas e os resultados mostraram melhora na sensibilidade à insulina, para ambos os grupos, após este período. Como os resultados entre os animais do grupo controle utilizados nestes experimentos não apresentaram diferenças com os animais utilizados no presente trabalho, realizamos a comparação com os ratos tratados com a dieta hiperlipídica por quatro semanas e, como esperado, os resultados da taxa de infusão de glicose foi significativamente maior para os animais submetidos a este protocolo de baixa intensidade de natação ($D = 3,73 \pm 0,12$ vs. $N = 11,31 \pm 0,44$ mg/Kg/min, $p < 0,05$). Estes dados são indicativos de que temos uma maior captação de glicose nos tecidos periféricos destes animais. Um dos motivos para esta resistência à insulina é que o principal transportador da glicose, o GLUT-4, depende do estímulo da insulina para que possa ser translocado para membrana plasmática (ZORZANO; PALACÍN; GUMA, 2005; PRADA *et al.*, 2006; McGEE & HARGREAVES, 2006; HOLLAND *et al.*, 2007; THORENS & MUECKLER, 2010).

No trabalho de Martinelli (2009) foi mostrado que a expressão do GLUT-4 estava aumentada no grupo natação, comparado aos animais controle. Mesmo não realizando a determinação da expressão do GLUT-4 dos ratos tratados com a dieta hiperlipídica, existem trabalhos na literatura que mostram a redução na população destes transportadores (HIGASHIDA; HIGUCHI; TERADA, 2009; XUE et al., 2011), o que possivelmente é o principal fator para menor taxa de infusão de glicose encontrada nos animais do grupo tratados com a dieta hiperlipídica neste estudo.

Além do GLUT-4, existem outras moléculas também estão envolvidas no metabolismo da glicose como a proteína quinase dependente de AMP (AMPK). A AMPK é uma enzima que detecta variações na necessidade energética celular, de forma que quando há redução da energia disponível, em situações como exercício físico, jejum prolongado e hipóxia, temos variação na sua expressão (KEMP et al., 1999; MUSI et al., 2001). Apesar de não estar totalmente elucidado na literatura como ocorre o aumento da produção de GLUT-4, estimulada pelo AMPK, existem estudos mostrando que a via desta proteína é semelhante a da insulina (HARDIE, 2003; TOWLER & HARDIE, 2007). Por conta disto, existem trabalhos que trazem a relação entre esta

enzima e o desenvolvimento da resistência à insulina e outras desordens metabólicas (RICHTER & RUDERMAN, 2009).

Estudos na literatura mostraram que a realização de exercícios físicos é um dos fatores que promovem o aumento na expressão da AMPK (HAWLEY & LESSARD, 2008; WOJTASZEWSKI & RICHTER, 2006). No estudo de Martinelli (2009), a quantidade de AMPK expressa pelos animais que realizaram a natação, foi maior comparada ao controle, porém, as diferenças não foram significativas. Isto sugere que a AMPK é uma proteína de regulação aguda, sendo que a análise da sua expressão após três dias do período de natação permitiu que seus valores retornassem a níveis semelhantes ao basal.

Diversos trabalhos na literatura mostraram que o tratamento com dieta hiperlipídica não influenciou as concentrações de AMPK nos animais que fizeram esta ingesta (KOISTINEN et al., 2003; STEINBERG et al., 2004; BRANDT et al., 2010; FILLMORE et al., 2010). Por outro lado, existem trabalhos que mostraram diminuição na expressão da AMPK de humanos obesos e que apresentavam quadro de resistência à insulina (SRIWIJITKAMOL et al., 2007; DeFILIPPIS et al., 2008). Com base nestas informações, podemos perceber a necessidade de novos estudos a fim de esclarecer os mecanismos moleculares da resistência à insulina.

Tabela 2 – Valores glicêmicos (mg/dL), valores de taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) e área sob a curva (AUC: Glicemia; mg/dL; GIR; mg/Kg/min) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos controle (C, n=7), submetidos a quatro semanas de tratamento com dieta hiperlipídica (D, n=6).

Grupo	1 ^a hora		2 ^a hora		Área sob Curva (2 horas)	
	Glicemia	GIR	Glicemia	GIR	Glicemia	GIR
C	99 ± 1,06	7,98 ± 0,07	103 ± 0,72	7,67 ± 0,04	12117 ± 523,7	938,3 ± 72,06
D	100 ± 1,68	5,00 ± 0,15*	106 ± 1,32	3,73 ± 0,12*	12929 ± 653,7	529,6 ± 58,14*

As coletas de sangue para análise da glicemia foram realizadas a cada 10 minutos durante 2 horas de ensaio. O tempo zero representa o início deste prazo, determinado após a estabilização da glicemia em valores próximos ao de jejum, verificada após três repetições seguidas. Uma coleta prévia à infusão de solução de glicose e insulina indica a glicemia de jejum. Dados apresentados como média ± EPM.

* P<0,05 D vs C; teste *t* de Student e AUC.

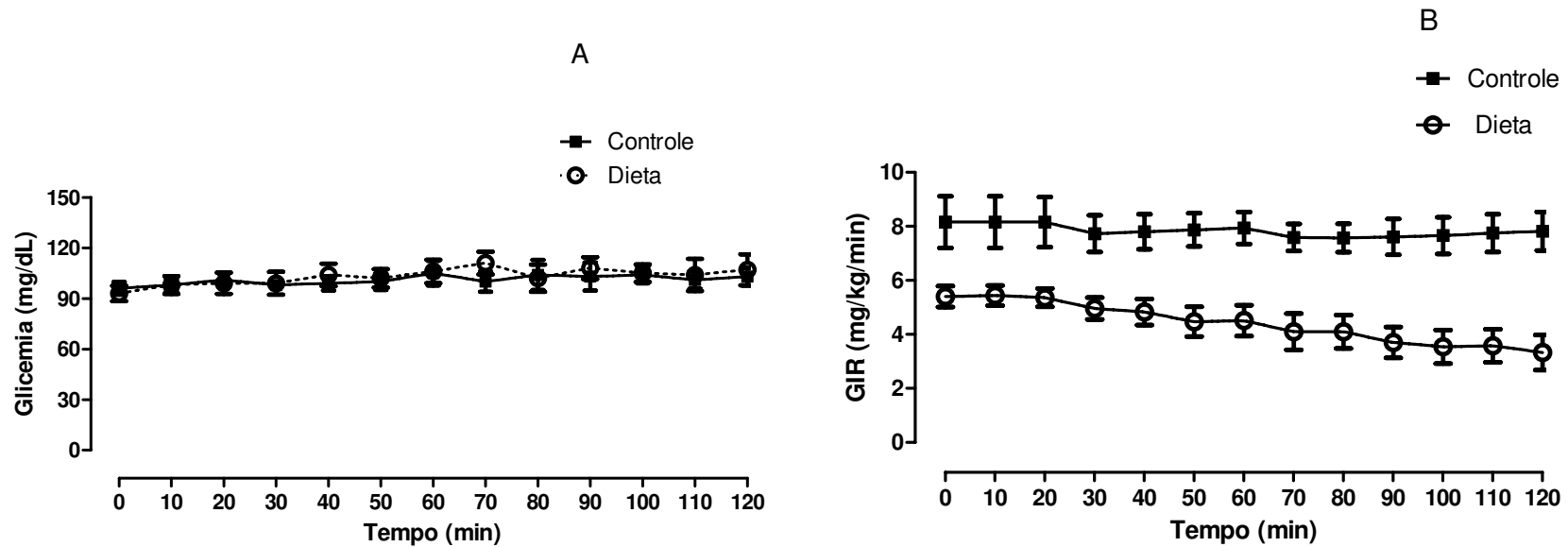


Figura 7 – Valores glicêmicos (A, mg/dL) e taxa de infusão de glicose (B, GIR mg/Kg/min) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos controle (n=7), submetidos a quatro semanas de ingestão de dieta hiperlipídica (n=6). As coletas foram realizadas a cada 10 minutos durante 2 horas de ensaio. O tempo zero representa o início deste prazo, determinado após a estabilização da glicemia em valores próximos ao de jejum, verificada após três repetições seguidas. Uma coleta prévia à infusão de solução de glicose e insulina indica a glicemia de jejum, e não está apresentada nesta figura. Os resultados estão expressos como média \pm EPM das coletas de amostras sanguíneas realizadas a cada 10 minutos. A análise estatística destes dados foi realizada pela medida da área sob a curva e está apresentada na tabela 2.

Captação de Glicose em Adipócitos Isolados

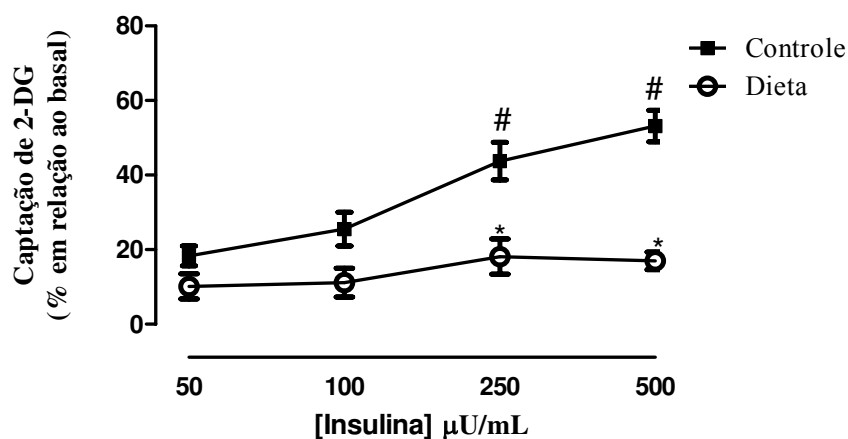
Além do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, também realizamos estudos de captação de glicose em adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica, ou que tenham feito ingesta da ração padrão. Os primeiros estudos realizados em nosso laboratório, utilizando esta técnica, foram realizados por Almeida (2008), que avaliou animais submetidos a três sessões de choques nas patas, em dias consecutivos. Estes dados estão descritos no texto a seguir com o objetivo de compararmos possíveis alterações na resposta à agonistas adrenérgicos e à insulina em diferentes modelos de ratos.

Inicialmente analisamos a captação da 2-D-[2,6-³H] deoxiglicose (2-DG), utilizando diferentes concentrações de insulina. Em adipócitos isolados de ratos controle, a insulina promoveu aumento significativo para as concentrações de 250 e 500 $\mu\text{U/mL}$, quando comparada a concentração 50 $\mu\text{U/mL}$ (C: 50 $\mu\text{U/mL}$ = $18,34 \pm 2,67$ vs. 250 $\mu\text{U/mL}$ = $43,74 \pm 5,04$; 500 $\mu\text{U/mL}$ = $53,12 \pm 4,22$ % de aumento na captação de 2-DG em relação ao basal, $p < 0,05$). Já para os ratos pertencentes ao grupo choque, esta mesma comparação, mostrou aumento significativo somente para concentração 500 $\mu\text{U/mL}$ (CH: 50 $\mu\text{U/mL}$ = $17,50 \pm 3,00$ vs. 500 $\mu\text{U/mL}$ = $38,40 \pm 6,10$ % de aumento na captação de 2-DG em relação ao basal, $p < 0,05$). Por sua vez, para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica por quatro semanas, a comparação com a concentração 50 $\mu\text{U/mL}$ não foi estatisticamente diferente para nenhuma das outras concentrações de insulina utilizadas.

Nossos resultados mostraram que os ratos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica por quatro semanas apresentaram captação de glicose significativamente menor, quando comparado aos ratos que ingeriram a dieta padrão, para as concentrações de 250 e 500 $\mu\text{U/mL}$ de insulina (250 $\mu\text{U/mL}$ - C = $43,74 \pm 5,04$ vs. D = $18,14 \pm 4,72$ %; 500 $\mu\text{U/mL}$ - C = $53,12 \pm 4,22$ vs. $16,97 \pm 2,37$ % de aumento na captação de 2-DG em relação ao basal, $p < 0,05$). Apesar destas diferenças encontradas, conforme descrito anteriormente, os ratos não estavam hiperglicêmicos no jejum e a comparação entre os grupos não mostrou diferenças estatisticamente significativas.

Quando comparamos os resultados da captação de 2-DG pelos ratos submetidos a três sessões de choque nas patas com o grupo controle, verificamos redução significativa na

captação apenas para concentração de 500 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina ($C = 53,12 \pm 4,22$ vs. $\text{CH} = 38,40 \pm 6,10$ % de aumento na captação de 2-DG em relação ao basal, $p < 0,05$). Também realizamos a comparação da captação de glicose entre o grupo submetido ao tratamento com a dieta hiperlipídica e os ratos submetidos às sessões de choques nas patas. Verificamos que os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica apresentaram redução significativa na captação de glicose induzida pela insulina para as concentrações de 100, 250 e 500 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (100 $\mu\text{U}/\text{mL}$ - $D = 11,15 \pm 3,88$ vs. $\text{CH} = 25,60 \pm 3,5$ %; 250 $\mu\text{U}/\text{mL}$ - $D = 18,14 \pm 4,72$ vs. $\text{CH} = 32,70 \pm 3,80$ %; 500 $\mu\text{U}/\text{mL}$ - $D = 16,97 \pm 2,37$ vs. $\text{CH} = 38,40 \pm 6,10$ % de aumento na captação de 2-DG em relação ao basal, $p < 0,05$). Os resultados dos grupos controle e que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica estão apresentados na figura 8.



Insulina	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0		0	
50	18,34	2,67	10,14	3,39
100	25,51	4,53	11,15	3,88
250	43,74 [#]	5,04	18,14 [*]	4,72
500	53,12 [#]	4,22	16,97 [*]	2,37

Figura 8. Efeito de diferentes concentrações de insulina na captação de 2-D-[2,6-³H] deoxiglicose (2-DG), pelos adipócitos epididimais isolados de ratos controle (n=9-11), submetidos a tratamento com dieta hiperlipídica por quatro semanas (n=4-5). Os valores representam a média ± EPM de experimentos distintos, realizados em quadruplicata e estão expressos em % de aumento na captação de 2-DG em relação ao basal/ 3×10^5 células em 15 minutos de incubação.

* $p < 0,05$ quando comparado ao controle (Test *t* de Student).

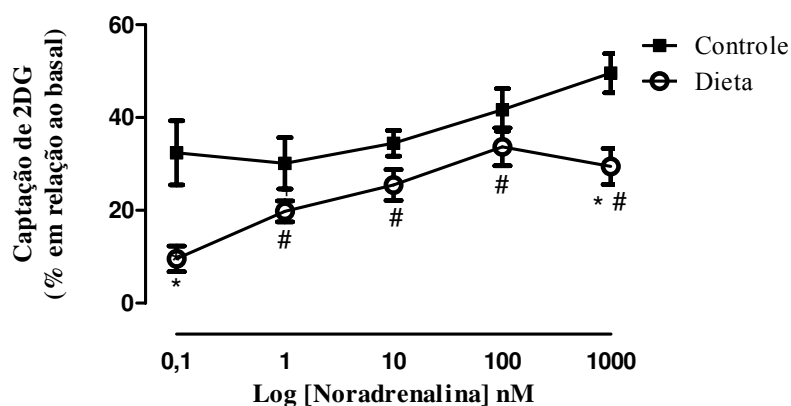
[#] $p < 0,05$ quando comparado com a concentração de 50 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina de seu respectivo grupo (ANOVA seguida do teste de Tukey).

O fato da captação de glicose pelos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal, estimulada pela insulina, estar significativamente reduzida para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica por quatro semanas, comparado aos ratos que ingeriram a dieta padrão, permitem sugerir o quadro de resistência à insulina, também verificado nos experimentos de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, que realizamos com estes ratos e estão descritos anteriormente.

Da mesma forma que observado com os adipócitos isolados dos animais tratados com a dieta hiperlipídica, os ratos submetidos ao estresse por choque nas patas apresentaram redução na captação de 2-DG na presença de insulina. A resistência à insulina neste modelo de choque nas patas já havia sido descrita em outros estudos do nosso laboratório (FARIAS-SILVA et al., 2002). Um dos pontos interessantes que também podemos analisar é que a captação de 2-DG foi significativamente menor nos adipócitos isolados dos animais do grupo dieta hiperlipídica, comparado ao grupo choque. Estas informações permitem sugerir que a dieta hiperlipídica é um fator eficiente para indução da resistência à insulina que o estresse por choque nas patas, sendo assim indicado como modelo de estudo desta doença.

Os adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal também foram incubados com diferentes concentrações de noradrenalina para análise da captação da 2-DG. Para os ratos submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica, a captação de glicose marcada pelos adipócitos isolados foi significativamente diferente para todas as concentrações de noradrenalina utilizadas, quando comparadas a concentração 0,1 nM. Apesar deste comportamento não ter sido observado no grupo controle, quando realizamos a comparação entre os dois grupos, verificamos redução significativa na captação de glicose pelos adipócitos isolados dos animais que ingeriram a dieta hiperlipídica para as concentrações de 0,1 e 1000 nM (0,1 nM - C = $32,39 \pm 6,94$ vs. D = $9,56 \pm 2,76$ %; 1000 nM - C = $49,57 \pm 4,23$ vs. D = $29,45 \pm 3,89$ % de aumento de captação de 2-DG em relação ao basal, $p < 0,05$).

Analisando a captação de glicose do adipócitos isolados dos animais submetidos às sessões de choques nas patas, verificamos que ocorreu aumento significativo da captação, tanto em relação ao controle quanto ao grupo dieta para todas as concentrações de noradrenalina utilizadas, exceto na concentração 1 nM, para comparação choque *versus* controle. Almeida (2008) identificou que esta captação de glicose, para os animais do grupo choque deve-se ao aumento da população de adrenoceptores α_1 . A discussão destes dados será realizada posteriormente.



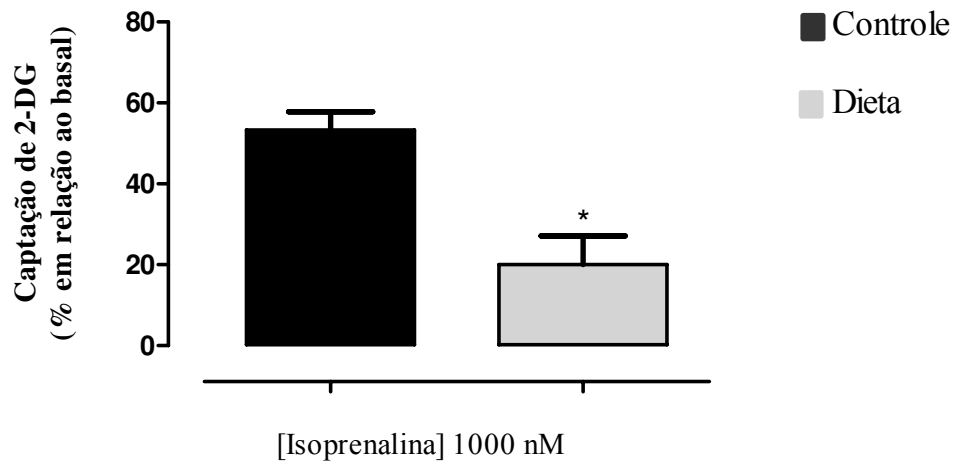
[Noradrenalina] nM	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0		0	
0,1	32,39	6,94	9,56*	2,76
1	30,15	5,52	19,78#	2,25
10	34,46	2,76	25,49#	3,33
100	41,67	4,59	33,69#	4,05
1000	49,57	4,23	29,45*#	3,89

Figura 9. Efeito de diferentes concentrações de noradrenalina na captação de 2-D-[2,6-³H] deoxiglicose (2-DG), pelos adipócitos epididimais isolados de ratos controle, submetidos a tratamento com dieta hiperlipídica. Os valores representam a média \pm EPM de 3-7 experimentos distintos, realizados em quadruplicata e estão expressos em % de aumento na captação de 2-DG em relação ao basal / 3×10^5 células em 15 minutos de incubação.

* $p < 0,05$ quando comparado ao controle (Test t de Student).

$p < 0,05$ quando comparado com a concentração de 0,1 nM de noradrenalina de seu respectivo grupo (ANOVA seguida do teste de Tukey).

A fim de verificar a participação de adrenoceptores β na captação da 2-DG, foi realizada incubação dos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal na presença do agonista beta não seletivo, isoprenalina. A concentração utilizada foi de 1000 nM e todos os grupos apresentaram aumento na quantidade de glicose captada, sendo significativo em relação ao basal, somente para os grupos controle e choque nas patas. Entretanto, a captação de glicose dos grupos controle e dos animais submetidos às sessões de choques nas patas não foram diferentes entre si. Por outro lado, os adipócitos isolados dos animais que fizeram ingesta da ração hiperlipídica apresentaram redução significativa da captação de glicose, quando comparado aos grupos controle, que ingeriu a dieta padrão, e ao grupo choque ($D = 20,07 \pm 7,10$ vs. $C = 53,28 \pm 4,50$ %; $CH = 58,35 \pm 8,75$ % de aumento de captação de 2-DG em relação ao basal, $p < 0,05$). Estes resultados demonstram uma subsensibilidade dos adrenoceptores beta nos animais que fizeram ingesta da ração hiperlipídica. Os resultados dos grupos controle e dieta hiperlipídica estão apresentados na figura 10.



[Isoprenalina] nM	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
1000	53,28	4,500	20,07*	7,10

Figura 10. Efeito da isoprenalina (1000 nM) na captação de 2-D-[2,6-³H] deoxiglicose (2-DG), pelos adipócitos epididimais isolados de ratos controle (n=4), submetidos a tratamento com dieta hiperlipídica por quatro semanas (n=6). Os valores representam a média ± EPM de experimentos distintos, realizados em quadruplicata e estão expressos em % de aumento na captação de 2-DG em relação ao basal / 3×10^5 células em 15 minutos de incubação.

* $p < 0,05$ quando comparado com o seu respectivo controle (Test *t* de Student).

O principal papel da insulina no organismo é estimular a captação de glicose pelas células, principalmente no tecido adiposo e dos músculos. O primeiro pesquisador que sugeriu a necessidade de um componente para o transporte da glicose através da membrana plasmática foi LeFevre em 1948, entretanto, a demonstração de que este processo era mediado por uma proteína aconteceu somente no final dos anos 70 (KASAHARA & HINKLE, 1977).

O mecanismo molecular por meio do qual a insulina realiza este estímulo foi descrito por Cushman e Wardzala em 1980. Eles propuseram que a insulina, após a ligação em seu receptor de membrana, desencadeia a migração de proteínas intracelulares para membrana plasmática, de forma a permitir a captação de glicose pela célula (CUSHMAN & WARDZALA, 1980). A estes transportadores foi designado o termo GLUTs – *Glucose Transporters* (MUECKLER et al., 1994). Atualmente, sabe-se que a captação de glicose é realizada por uma família de transportadores de glicose, constituída por 14 tipos diferentes de proteínas (THORENS & MUECKLER, 2010), sendo que os transportadores da classe I (GLUT-1 a 4) são os que melhores representam esta família (SIMPSON et al., 2008).

O primeiro transportador de glicose determinado foi o GLUT-1, em 1985 (MUECKLER et al., 1985). Este transportador é uma das proteínas de membrana mais estudadas na literatura, mesmo assim, ainda existem perguntas para serem respondidas acerca deste transportador, que está presente em glóbulos vermelhos e células endoteliais, como o mecanismo que promove a captação da glicose (MUECKLER & MAKEPEACE, 2009). O GLUT-2 está presente nas células β do pâncreas, células epiteliais do intestino e rins, além dos hepatócitos (THORENS, 1992). O GLUT-3 é o principal transportador de glicose neuronal e está presente tanto nos dendritos, quanto nos axônios e sua expressão nas diferentes regiões do cérebro está diretamente relacionada com a utilização regional de glicose (THORENS & MUECKLER, 2010).

Além destes três subtipos de transportadores de glicose, um dos mais importantes para o metabolismo corporal é o GLUT-4. O GLUT-4 foi descoberto no final dos anos 80 por James e colaboradores e, desde então, o número de trabalhos realizados e que envolvem a participação destes transportadores é extremamente elevado. Um dos motivos para isto deve-se ao fato de sua importância na regulação do metabolismo da glicose no organismo, além da relação como inúmeras patologias como a obesidade e a Diabetes Mellitus. Este transportador é o único responsável por realizar o transporte de glicose, dependente da insulina, pelos músculos esqueléticos e tecido adiposo (HENRIKSEN et al., 1990; LAWRENCE et al.,

1992). A insulina liga ao seu receptor e realiza a fosforilação no resíduo de tirosina, o que resulta em uma cascata intracelular de eventos que incluem a fosforilação dos substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS 1-2) e consequente ativação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) (FOLLI et al., 1992; CONSITT; BELL; HOUMARD, 2009).

A ativação da PI3-K regula a ação da proteína quinase C atípica (aPKC) assim como da Akt que é responsável pela ativação do substrato 160kD da Akt (AS160). Atualmente, alguns autores acreditam que a translocação do GLUT-4 para membrana é coordenada pela aPKC e AS160 (CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004; KRAMER et al., 2006).

Nossos ensaios mostraram que a captação de glicose estimulada pela insulina estava significativamente menor em animais que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, para as concentrações de 250 e 500 $\mu\text{U}/\text{mL}$, comparado aos animais que fizeram ingesta da dieta padrão. Estes resultados corroboram com os achados obtidos no *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, em que observamos uma taxa de infusão da glicose, significativamente menor, durante as duas horas de experimento para estes animais que ingeriram a dieta hiperlipídica. Conforme descrito anteriormente, apesar de não realizarmos a determinação da expressão de GLUT-4 nos adipócitos destes ratos, existem relatos na literatura mostrando menor captação de glicose em animais que fizeram ingesta de dieta hiperlipídica (HIGASHIDA; HIGUCHI; TERADA, 2009; XUE et al., 2011). Já para os animais que foram submetidos às sessões de choques nas patas, a captação de glicose, estimulada pela insulina, foi significativamente menor somente para concentração de 500 $\mu\text{U}/\text{mL}$. Esta redução na sensibilidade da insulina está de acordo com os resultados do trabalho de Farias-Silva et al. (2002), que observou redução dos efeitos anti-lipolíticos da insulina, nos adipócitos isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas. As concentrações em que verificamos aumento significativo da captação de glicose são elevadas, comparadas as concentrações fisiológicas de ratos no estado de jejum ou alimentados. Animais submetidos a ensaio de *iv*GTT apresentaram glicemia de jejum de aproximadamente 20 $\mu\text{U}/\text{mL}$ e 80 $\mu\text{U}/\text{mL}$ quando submetidos a sobrecarga de glicose (STRIFFLER & NADLER, 2004). Durante a realização de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, Baret e colaboradores (2002), encontraram glicemia de jejum de aproximadamente 30 $\mu\text{U}/\text{mL}$ e cerca de 145 $\mu\text{U}/\text{mL}$ no final do ensaio. Com base nestas informações, seria esperado que obtivéssemos aumento significativo da captação de glicose a partir da concentração de 100 $\mu\text{U}/\text{mL}$, o que não aconteceu, mas que foi

observado nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{U}/\text{mL}$, exceto para o grupo choque, em que o aumento foi significativo somente em 500 $\mu\text{U}/\text{mL}$.

A ingesta de ração hiperlipídica promove aumento das concentrações de ácidos graxos livres, o que pode ser um dos fatores responsáveis pela redução significativa da captação de glicose para os animais que foram alimentados com esta dieta. Alguns estudos demonstraram que a captação de glicose no tecido muscular estaria prejudicada por conta deste aumento na quantidade de ácidos graxos livres disponíveis no plasma. O provável mecanismo para isto seria que estes ácidos graxos livres aumentariam as concentrações intracelulares de ácidos graxos de cadeia longa que promoveriam a elevação de diacilglicerol (DAG), triacilgliceróis (TAG) e ceramidas. Tanto os ácidos graxos de cadeia longa, quanto os DAG, são capazes de reduzir a ação da insulina, pela via da proteína quinase C (PKC). A PKC aumenta a fosforilação no resíduo de serina do receptor da insulina, o que irá promover uma redução na associação entre o IRS1 e a PI3-K, resultando na diminuição da captação de glicose. Já as ceramidas são capazes de reduzir a captação da glicose estimulada pela insulina, via diminuição da fosforilação da Akt (CONSITT; BELL; HOUMARD, 2009).

Outros estudos na literatura também mostraram que a dieta hiperlipídica é responsável por interferir diretamente nas concentrações intracelulares das moléculas envolvidas na captação de glicose estimulada pela insulina. Speed et al. (2011), mostraram que a dieta hiperlipídica em ratos promoveu redução na expressão de Akt em neurônios da substância negra e do núcleo estriado. A redução nas quantidades de IRS-1 também foi identificada em células musculares de ratos que ingeriram dieta hiperlipídica (ANSARULLAH et al., 2011). No estudo de Stefanyk e colaboradores (2011), a atividade da AS160 também foi significativamente reduzida nos animais alimentados com dieta hiperlipídica.

Com base nestas informações, podemos sugerir que a redução na captação de glicose estimulada pela insulina, possivelmente, está significativamente diminuída nos ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, devido alterações na atividade de enzimas envolvidas na captação de glicose estimulada pela insulina, fato foi observado em outros estudos com este tipo de dieta.

Conforme descrito anteriormente, os animais submetidos a estresse por choque nas patas também apresentaram redução significativa na captação de glicose pelos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal. Existem relatos na literatura indicando que o quadro de resistência à insulina pode ser desencadeado pelo aumento da atividade simpática devido à

ativação de adrenoceptores α_1 (McCARTY, 2004). O provável mecanismo seria o aumento da concentração de cálcio no interior da célula promovendo alterações na captação glicose via GLUT-4 (BEGUM et al., 1993; REUSCH et al., 1993). Como estes animais estão estressados, provavelmente a redução na captação de glicose induzida pela insulina pode estar reduzida por conta desta via.

Estudos na literatura mostraram que a captação de glicose é estimulada tanto pela insulina quanto pelas catecolaminas (NOGAKI, 2000; SMITH, 2002). As catecolaminas endógenas, adrenalina e a noradrenalina, são hormônios cuja ação é realizada por meio de adrenoceptores (JENSEN et al., 1996; CAREY, 1998).

Os adrenoceptores 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).

Alguns destes adrenoceptores estão envolvidos com a captação de glicose. No estudo de Faintrenie & Geloén (1998), foi demonstrada a participação dos adrenoceptores α_1 na captação de glicose em adipócitos de ratos. Posteriormente, em adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal, foi demonstrado que a captação de glicose é mediada pelos adrenoceptores do tipo α_{1a} (CHENG et al., 2000) Em estudo realizado com humanos, Boschmann et al. (2002) também demonstraram aumento na captação de glicose de indivíduos eutróficos via adrenoceptores α_1 . Relatos na literatura mostram que ativação destes adrenoceptores é responsável por realizar a hidrólise de fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato pela fosfolipase C (PLC), através da proteína Gq/11, resultando na produção de inositol 1,4,5-fosfato que promove a liberação de cálcio e do DAG, que ativam a proteína quinase C (PKC) (ZHONG & MINNEMAN, 1999). Segundo Kelly et al. (1992), estes lipídeos da via da PLC podem servir de substrato para PI3K, que desempenha papel fundamental na captação de glicose.

A fim de analisar a influência dos adrenoceptores na captação de glicose, realizamos a incubação de diferentes concentrações de noradrenalina com os adipócitos isolados do tecido epididimal dos animais submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica ou padrão. Os animais que ingeriram a dieta padrão apresentaram aumento significativo da captação de

glicose estimulada pela noradrenalina para todas as concentrações utilizadas, quando comparadas as concentrações basais. Já nos animais que ingeriram a dieta hiperlipídica, somente a partir da concentração 10 nM de noradrenalina, tivemos aumento significativo da captação de glicose em relação aos valores basais. Por sua vez, quando realizamos a comparação entre os grupos controle e dieta hiperlipídica, verificamos que a captação de glicose pelos adipócitos isolados dos animais que fizeram ingesta da ração hiperlipídica, foi significativamente menor para as concentrações de 0,1 e 1000 nM. Conforme descrito anteriormente, existem várias enzimas intracelulares que estão envolvidas na captação de glicose por meio do adrenoceptor α_1 e influenciam outras vias intracelulares como a via da PI3-K, que é estimulada pela insulina. Apesar de não determinado neste estudo, é possível que a estimulação dos adrenoceptores α_1 realize o *cross-talking* com esta via, o que interfere na captação de glicose. Considerando esta hipótese, bem como os achados descritos previamente para captação estimulada pela insulina, podemos inferir que esta redução significativa na captação de glicose estimulada pela noradrenalina, pelos adipócitos dos animais que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, esteja realizada com este mecanismo de *cross-talking*.

A captação de glicose pelos adipócitos isolados dos ratos submetidos às sessões de choques nas patas foi significativamente maior que os valores basais a partir da concentração de 1 nM. Entretanto, quando realizada a comparação com os animais controle, a captação de glicose para os animais estressados foi significativamente maior desde a concentração 10 nM (C: 10 nM = $34,46 \pm 2,76$ vs. CH = $56,99 \pm 3,25$ %; C: 100 nM = $41,67 \pm 4,59$ vs. CH = $62,56 \pm 5,78$ %; C: 1000 nM = $49,57 \pm 4,23$ vs. CH = $79,54 \pm 2,90$ % de aumento de captação de 2-DG em relação ao basal, $p < 0,05$) e, comparado aos animais que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, o aumento foi significativo a partir da concentração 1 nM (D: 1 nM = $19,78 \pm 2,25$ vs. CH = $29,66 \pm 3,38$ %; D: 10 nM = $25,49 \pm 3,33$ vs. CH = $56,99 \pm 3,25$ %; D: 100 nM = $33,69 \pm 4,05$ vs. CH = $62,56 \pm 5,78$ %; D: 1000 nM = $29,45 \pm 3,89$ vs. CH = $79,54 \pm 2,90$ % de aumento de captação de 2-DG em relação ao basal, $p < 0,05$). Este comportamento foi diferente do observado em relação à captação de glicose estimulada pela insulina, em que verificamos redução significativa, comparado ao controle, para a concentração de 500 $\mu\text{U/mL}$. Alguns estudos na literatura demonstraram que a população de adrenoceptores, tanto α quanto β , estão elevadas em animais estressados, existindo associação com a quantidade de corticosterona (SPADARI & DEMORAES, 1988 FLUGGE, 1999; MYSLIVECEK et al., 2003). O estudo de Verago et al. (2001) verificou que estes animais submetidos a estresse por choque nas patas apresentava elevação de 50% na concentração de corticosterona, quando

comparado ao grupo controle. Possivelmente este aumento da concentração de corticosterona está promovendo elevação na população destes adrenoceptores, o que fez com que esta captação de glicose, estimulada pela noradrenalina, esteja elevada nestes animais submetidos a estresse por choque nas patas.

Existem informações na literatura que demonstram a participação dos adrenoceptores β na captação de glicose de adipócitos isolados, sendo que a intensidade deste transporte é dependente da concentração dos agonistas β . Altas concentrações destes agonistas promoveriam redução na captação de glicose, enquanto que baixas concentrações estimulariam a captação (KASHIWAGI & FOLEY, 1982; LANDSBERG & YOUNG, 1992).

O mecanismo de ação dos adrenoceptores 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 quantidade de AMPc formado estaria relacionada com o efeito de estimular ou inibir a captação de glicose (KASHIWAGI & FOLEY, 1982).

Neste estudo, realizamos a análise da captação de glicose na presença do agonista β não seletivo, isoprenalina. Foi utilizada somente a concentração de 1000 nM, para verificar o que ocorria na captação. No caso dos animais que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, observamos que a captação de glicose foi cerca de 20% maior, quando comparado aos valores basais, entretanto, este aumento não apresentou significância estatística. Por outro lado, esta mesma concentração foi significativamente maior para os grupos controle e estresse, quando comparado aos valores basais. A comparação entre estes grupos não apresentou diferenças estatísticas, porém, ambos foram significativamente maiores que os animais que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica.

Existem relatos de uma correlação inversa entre a concentração de AMPc e a captação de glicose (TAYLOR & HALPERIN, 1979). Estudos na literatura já mostraram que a expressão dos adrenoceptores β pode estar alterada em animais que fizeram ingesta de dieta hiperlipídica. A expressão e atividade dos adrenoceptores β_3 de adipócitos está significativamente reduzida em camundongos tratados com dieta hiperlipídica (COLLINS et al., 1997; SURWIT et al., 2000). Thackeray e colaboradores (2011) constataram redução na afinidade do [(3)H]CGP12177, um antagonista não seletivo de adrenoceptor β , na musculatura cardíaca de ratos da linhagem Sprague-Dawley, sendo esta redução atribuída a

ingesta da dieta hiperlipídica. Com base nestas informações, um dos prováveis motivos para redução na captação de glicose dos animais que fizeram ingesta da ração hiperlipídica, quando comparada aos grupos controle e choque pode estar relacionado com a redução na população de adrenoceptores β , o que diminui a ação da isoprenalina. Por outro lado, os dados dos ratos que fizeram ingesta da dieta padrão estão de acordo com trabalhos da literatura, em que observamos aumento da captação de glicose estimulada pelos adrenoceptores β_3 , tanto no tecido muscular, quanto no tecido adiposo branco e marrom (ABE et al., 1993; LIU & STOCK, 1995; NIKAMI et al., 1996; DeSOUZA et al., 1997).

Outra possível explicação para esta redução na captação de glicose, estimulada pela isoprenalina, para os animais que ingeriram a dieta hiperlipídica, pode estar ligada a outras vias intracelulares. Uma pequena elevação na quantidade de AMP promove aumento direto da ação de uma enzima denominada AMPK (WINDER & HARDIE, 1999). Existem estudos mostrando que esta enzima está envolvida com a captação de glicose no tecido muscular, por meio de dois mecanismos, um que envolve diretamente a translocação do GLUT-4 e outro que aumenta a sensibilidade à insulina (ZOU et al., 2004; SCHIMMACK; DeFRONZO; MUSI, 2006). Conforme relatos descritos anteriormente, sabemos que a translocação do GLUT-4 em animais hiperlipidêmicos está reduzida o que podemos inferir para os animais utilizados neste estudo, visto a redução na sensibilidade à insulina que foi observada, para esta resposta. Entretanto, estudos funcionais com adipócitos isolados de ratos hiperlipidêmicos ingerindo a dieta por seis semanas não apresentaram alteração na resposta anti-lipolítica da insulina (WOLF-NUNES, 2004). A ação da isoprenalina estimulando os adrenoceptores β pode ter promovido a formação de maior quantidade de AMP e conseqüentemente AMPK, entretanto, este aumento não conseguiu induzir o deslocamento deste transportador para membrana plasmática a fim de realizar a captação de glicose.

O comportamento desta captação de glicose para os animais submetidos às sessões de choques nas patas é semelhante ao observado no grupo controle, com estimulação significativa em relação aos valores basais. O estudo de Nevzorova et al. (2006) demonstrou que a estimulação dos adrenoceptores β_2 pode aumentar a captação de glicose em células musculares L6, via AMPc e PI3K. Já foi demonstrado que o modelo de estresse por choque nas patas promove aumento da população de adrenoceptores β_2 em adipócitos epididimais (FARIAS-SILVA et al., 2004). Desta forma, podemos sugerir que este aumento na captação

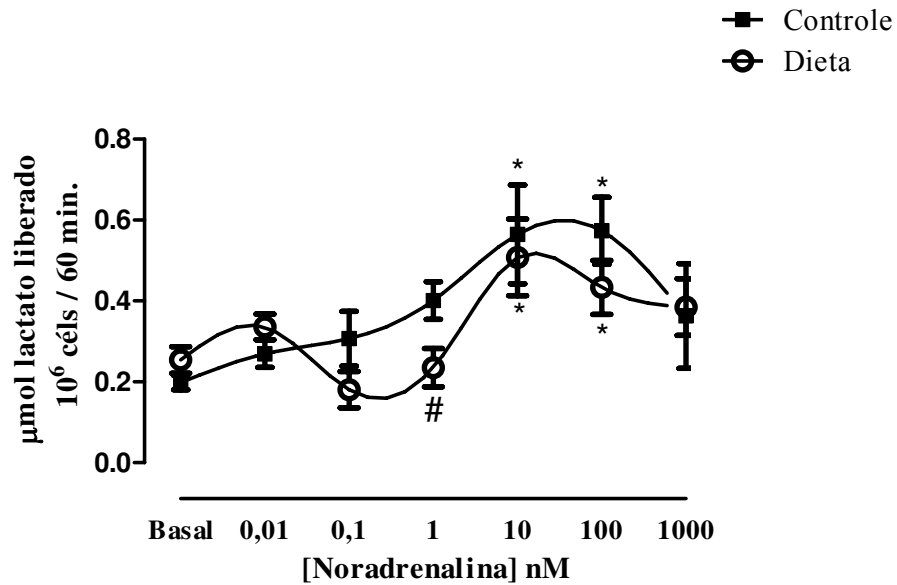
de glicose dos animais submetidos a estresse por choque nas patas, pode ter relação com a elevação na população de adrenoceptores β_2 do tecido adiposo epididimal.

Com base nestas informações, devemos considerar que a captação de glicose é um processo que envolve diversas vias intracelulares e mecanismos de *cross-talking*. Os diferentes resultados observados para cada um dos grupos e cada uma das substâncias testadas, demonstram a complexidade de interação destas vias e da necessidade de estudo aprofundado com cada um destes modelos, visto que diferentes possibilidades podem ser responsáveis pelos resultados verificados na captação de glicose pelos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de cada grupo experimental, exigindo desta forma estudos complementares com análises distintas para melhor precisão no entendimento das alterações.

Produção de lactato pelos adipócitos isolados

A análise dos resultados para liberação de lactato foi feita da seguinte maneira: Primeiramente, foi verificada a quantidade liberada deste marcador metabólico em cada um dos tratamentos realizados, descritos na metodologia, para cada um dos grupos isoladamente. Em seguida, foi feita a comparação entre os ratos que fizeram ingesta da dieta padrão ou hiperlipídica. Como foram realizados diversos experimento, em vários dias, e com curvas distintas, os valores basais dos grupos controle podem ser diferentes quando duas tabelas são analisadas, entretanto, estes valores não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. A média de liberação basal de lactato dos animais controle, considerando todos os experimentos, foi de $0,1961 \pm 0,01 \mu\text{mol}/10^6 \text{ células}.60 \text{ min.}$ e para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica ao longo de quatro semanas, a média dos valores basais foi de $0,2167 \pm 0,01 \mu\text{mol}/10^6 \text{ células}.60 \text{ min.}$

A liberação de lactato estimulada pela noradrenalina para os ratos do grupo controle é mostrada na figura 11. A produção de lactato foi significativamente maior nas concentrações de 10 e 100 nM comparado ao valor basal de lactato que foi liberado (BLC = Liberação basal de lactato ratos controle) (BLC = $0,1980 \pm 0,02$ vs. 10 nM = $0,5648 \pm 0,12$; 100 nM = $0,5738 \pm 0,08 \mu\text{mol}/10^6 \text{ células}.60\text{min}$, $p < 0,05$). Esta mesma condição se repetiu no caso dos ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica. Encontramos diferença significativa na liberação de lactato comparado ao valor basal produzido (BLD = Liberação basal de lactato dos ratos que ingeriram dieta hiperlipídica) para as mesmas concentrações de 10 e 100 nM (BLD = $0,2542 \pm 0,03$ vs. 10 nM = $0,5076 \pm 0,09$; 100 nM = $0,4338 \pm 0,07 \mu\text{mol}/10^6 \text{ células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 11). Quando realizamos a comparação entre os ratos que fizeram ingesta da dieta padrão ou hiperlipídica para a liberação de lactato estimulada pela noradrenalina, encontramos diferenças estatísticas significativas somente para a concentração de 1 nM, onde observamos que os ratos do grupo dieta produziram quantidade, significativamente menor, de lactato (Controle = $0,4011 \pm 0,05$ vs. Dieta = $0,2352 \pm 0,05 \mu\text{mol}/10^6 \text{ células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 11).

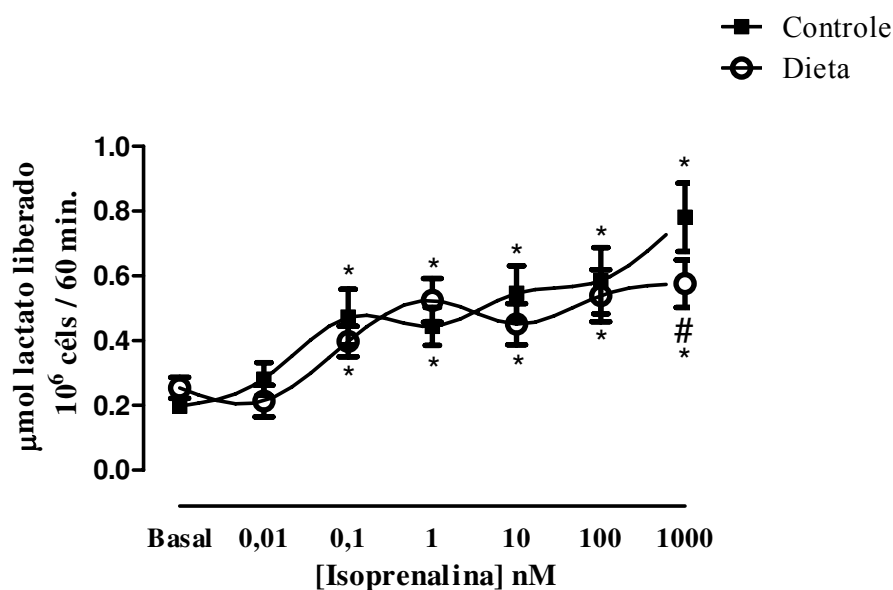


[Noradrenalina nM]	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,1980	0,02	0,2542	0,03
0,01	0,2695	0,03	0,3358	0,03
0,1	0,3067	0,07	0,1807	0,04
1	0,4011	0,05	0,2352 [#]	0,05
10	0,5648*	0,12	0,5076*	0,09
100	0,5738*	0,08	0,4338*	0,07
1000	0,3630	0,13	0,3852	0,07

Figura 11. Liberação de lactato basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6$ células.60 min.) por diferentes concentrações de noradrenalina para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão ($n=4-6$) ou hiperlipídica ($n=4-9$) por quatro semanas. Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. 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; # $p < 0,05$ controle vs. dieta para mesma concentração.

Os adipócitos isolados também foram incubados com diferentes concentrações do agonista β , isoprenalina. Para os ratos que fizeram ingesta da dieta padrão, na presença deste agonista, tivemos liberação de lactato significativamente maior para as concentrações de 0,1, 1, 10, 100 e 1000 nM, quando comparado ao valor basal (BLC = $0,1980 \pm 0,02$ vs. 0,1 nM = $0,4723 \pm 0,09$; 1 nM = $0,4440 \pm 0,06$; 10 nM = $0,5463 \pm 0,08$; 100 nM = $0,5852 \pm 0,10$; 1000 nM = $0,7814 \pm 0,11$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 12). Estes resultados também foram observados para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica ao longo de quatro semanas. As mesmas concentrações de isoprenalina foram significativamente diferentes do valor basal (BLD = $0,2542 \pm 0,03$ vs. 0,1 nM = $0,3974 \pm 0,05$; 1 nM = $0,5247 \pm 0,07$; 10 nM = $0,4511 \pm 0,06$; 100 nM = $0,5391 \pm 0,08$; 1000 nM = $0,5762 \pm 0,07$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 12).

A comparação da liberação de lactato, estimulada por diferentes concentrações de isoprenalina, entre os ratos que fizeram ingesta da dieta padrão ou hiperlipídica foi significativamente diferente para a concentração de 1000 nM, onde observamos que os ratos do grupo dieta produziram quantidade significativamente menor de lactato (Controle = $0,7814 \pm 0,11$ vs. Dieta = $0,5762 \pm 0,07$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 12).

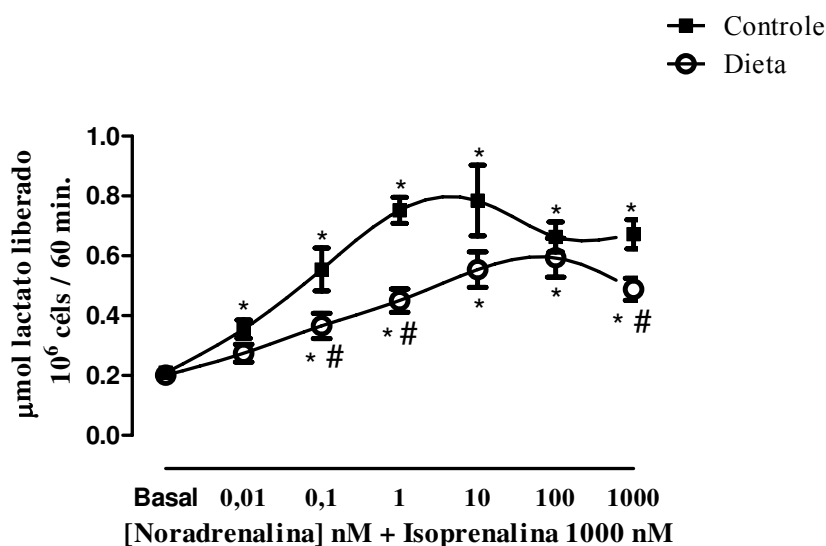


[Isoprenalina nM]	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,1980	0,02	0,2542	0,03
0,01	0,2814	0,05	0,2137	0,05
0,1	0,4723 *	0,09	0,3974 *	0,05
1	0,4440 *	0,06	0,5247 *	0,07
10	0,5463 *	0,08	0,4511 *	0,06
100	0,5852 *	0,10	0,5391 *	0,08
1000	0,7814 *	0,11	0,5762 *#	0,07

Figura 12. Liberação de lactato basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6$ células.60 min.) por diferentes concentrações de isoprenalina para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão ($n=4-6$) ou hiperlipídica ($n=4-8$) por quatro semanas. Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. 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; # $p < 0,05$ controle vs. dieta para mesma concentração.

Quando foi realizada a incubação de noradrenalina juntamente com isoprenalina (1000 nM) tivemos uma liberação de lactato significativa nas concentrações de 0,01 a 1000 nM, para os ratos que fizeram ingesta da dieta padrão, comparado ao seu valor basal (BLC = $0,2100 \pm 0,02$ vs. 0,01 nM = $0,3554 \pm 0,03$; 0,1 nM = $0,5545 \pm 0,07$; 1 nM = $0,7520 \pm 0,04$; 10 nM = $0,7850 \pm 0,12$; 100 nM = $0,6634 \pm 0,05$; 1000 nM = $0,6723 \pm 0,05$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 13). Para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, esta mesma condição, apresentou diferenças significativas para as concentrações de 0,1 a 1000 nM (BLD = $0,2017 \pm 0,02$ vs. 0,1 nM = $0,3659 \pm 0,04$; 1 nM = $0,4509 \pm 0,04$; 10 nM = $0,5541 \pm 0,04$; 100 nM = $0,5940 \pm 0,06$; 1000 nM = $0,4887 \pm 0,04$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 13). A fim de verificar se existia um efeito somatório da presença de noradrenalina e isoprenalina, comparamos com a liberação de lactato, estimulada pelas diferentes concentrações de noradrenalina utilizadas. No caso dos ratos que fizeram ingesta da dieta padrão, foi verificado diferenças significativas para as concentrações de 1 e 1000 nM, sendo que a presença dos dois agonistas promoveu maior liberação do lactato. Já para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica este aumento aconteceu e foi significativo para as concentrações de 0,1 e 1 nM.

Quando comparamos os dois grupos, a quantidade de lactato que foi liberada pelos adipócitos isolados na presença de noradrenalina e isoprenalina (1000 nM), foi significativamente menor para as concentrações de noradrenalina de 0,1, 1 e 1000 nM no grupo dieta, comparado aos ratos controle (Figura 13).



[Noradrenalina nM]	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,2101	0,02	0,2017	0,02
0,01	0,3554*	0,03	0,2744	0,03
0,1	0,5545*	0,07	0,3659*#	0,04
1	0,7520*	0,04	0,4509*#	0,04
10	0,7850*	0,12	0,5541*	0,06
100	0,6634*	0,05	0,5940*	0,06
1000	0,6723*	0,05	0,4887*#	0,04

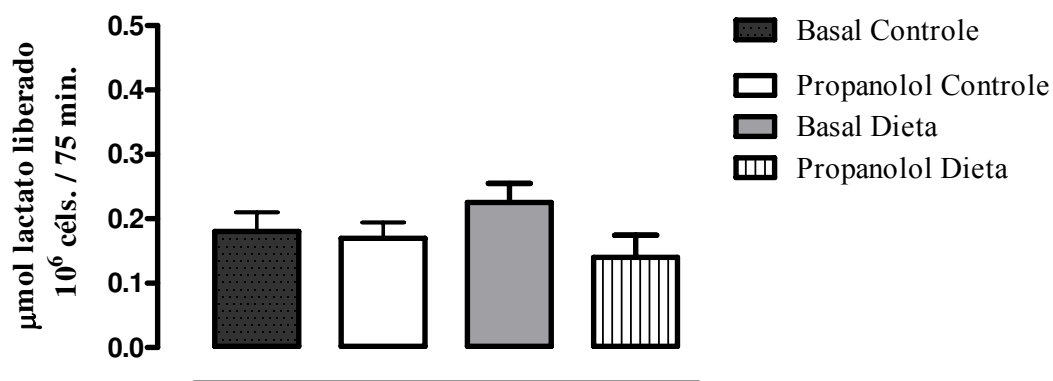
Figura 13. Liberação de lactato basal e estimulada ($\mu\text{mol}/10^6$ células.60 min.) por diferentes concentrações de noradrenalina juntamente com isoprenalina (1000 nM) para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão ($n=10-16$) ou hiperlipídica ($n=10-16$) por quatro semanas. Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. 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; # $p < 0,05$ controle vs. dieta para mesma concentração.

Os adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal também foram incubados com antagonistas adrenérgicos, como o propranolol e o ICI 118,551. O propranolol é um antagonista β adrenérgico, enquanto que o ICI 118,551 é um antagonista específico para o receptor adrenérgico β_2 .

A liberação de lactato pelos adipócitos isolados, na presença de propranolol (1000 nM), não foi estatisticamente significativa, quando comparamos os dois grupos (Controle = $0,1699 \pm 0,02$ vs. Dieta = $0,1402 \pm 0,03$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.75\text{min}$), nem quando comparado com os respectivos valores basais, na ausência deste antagonista (Figura 14). Também realizamos a comparação da liberação de lactato pelos adipócitos, na presença de propranolol (1000 nM), juntamente com isoprenalina na mesma concentração. Os resultados também não foram diferentes entre os dois grupos (Controle = $0,2870 \pm 0,05$ vs. Dieta = $0,3024 \pm 0,04$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.75\text{min}$). Da mesma forma que observado para o propranolol isolado, a presença da isoprenalina (1000 nM) juntamente com o propranolol (1000 nM) não foi estatisticamente diferente dos valores basais para nenhum dos grupos (Figura 15).

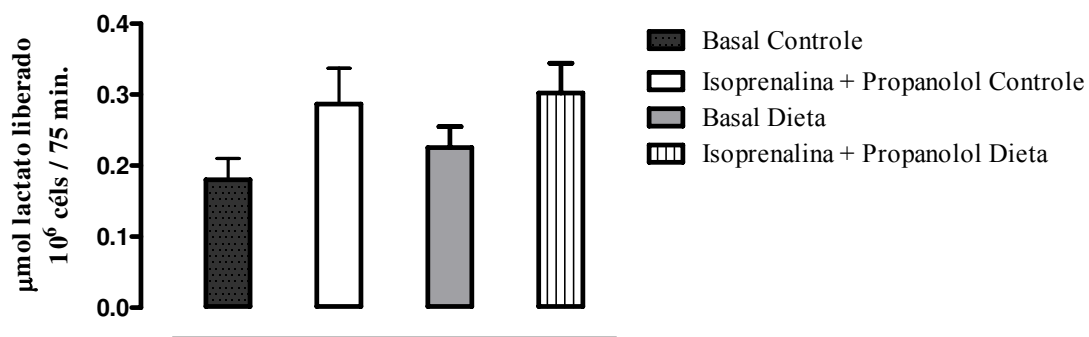
Quando realizamos a incubação dos adipócitos com diferentes concentrações de noradrenalina e propranolol (1000 nM), verificamos que para os ratos do grupo controle, a liberação de lactato foi significativamente maior para as concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 nM, quando comparados a concentração basal (BLC = $0,1801 \pm 0,03$ vs. 0,1 nM = $0,3317 \pm 0,04$; 1 nM = $0,2853 \pm 0,03$; 10 nM = $0,4923 \pm 0,14$; 100 nM = $0,4062 \pm 0,06$; $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.75\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 16). Já para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, a única concentração que apresentou valor significativamente maior em comparação ao basal foi a de 100 nM (BLD = $0,1801 \pm 0,03$ vs. 100 nM = $0,4062 \pm 0,06$; $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.75\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 16). Também realizamos a comparação da quantidade de lactato liberada pelos adipócitos na presença de noradrenalina, juntamente com o propranolol (1000 nM), e somente a noradrenalina. Considerando os dois grupos, a única concentração de noradrenalina isolada, que promoveu liberação significativamente maior de lactato, foi a de 1 nM para os ratos que fizeram ingesta da dieta padrão.

A quantidade de lactato que foi liberada pelos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal, estimulados por diferentes concentrações de noradrenalina, na presença de propranolol (1000 nM), não foi estatisticamente diferente para nenhuma das concentrações analisadas, na comparação entre os grupos (Figura 16).



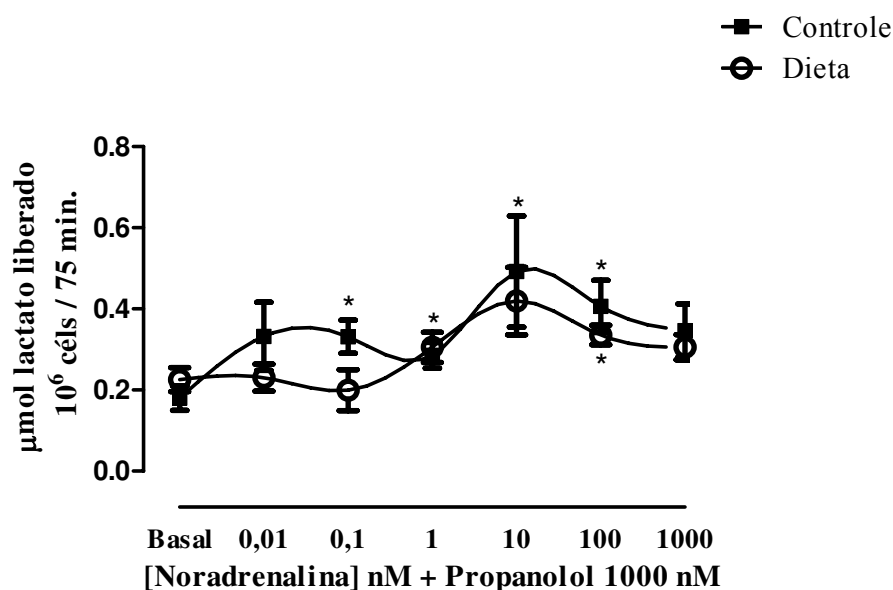
Tratamento	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,1801	0,02997	0,2253	0,02958
Basal + Propanolol (1000 nM)	0,1699	0,02439	0,1402	0,03428

Figura 14. Liberação basal de lactato na presença ou ausência de propanolol (1000 nM) para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão (n=6) ou hiperlipídica (4-6) por quatro semanas. Os valores representam a média ± EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$.



Tratamento	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,1801	0,03	0,2253	0,03
Isoprenalina (1000 nM) + Propanolol (1000 nM)	0,2870	0,05	0,3024	0,04

Figura 15. Liberação basal e estimulada de lactato na ausência ou presença de isoprenalina (1000 nM) e propanolol (1000 nM) para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=6-7) ou hiperlipídica (n=4-6) por quatro semanas. Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$.



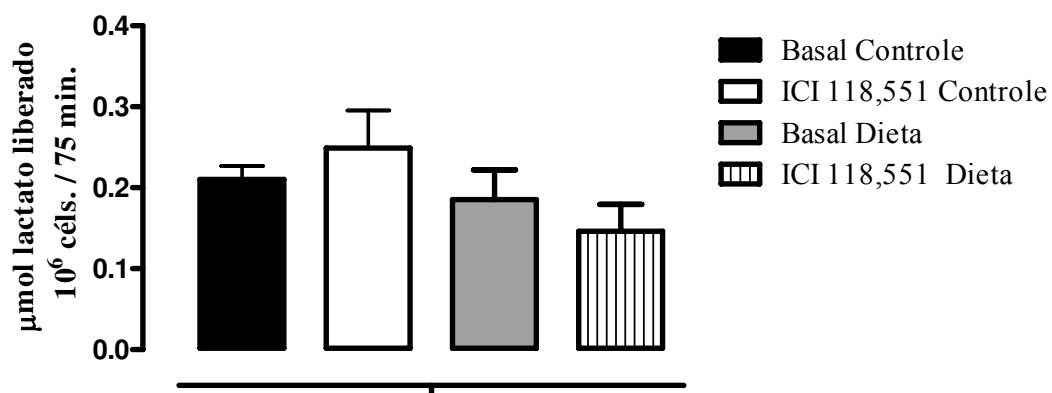
[Noradrenalina nM]	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,1801	0,03	0,2253	0,03
0,01	0,3323	0,08	0,2307	0,03
0,1	0,3317*	0,04	0,1995	0,05
1	0,2853*	0,03	0,3053	0,04
10	0,4923*	0,14	0,4194	0,08
100	0,4062*	0,06	0,3353*	0,02
1000	0,3465	0,07	0,3058	0,03

Figura 16. Liberação de lactato em resposta a diferentes concentrações de noradrenalina juntamente com propranolol (1000 nM) de adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=4-7) ou hiperlipídica (n=4-6) por quatro semanas. Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. 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.

Na presença de ICI 118,551 (50 nM), a liberação basal de lactato pelos adipócitos isolados não foi estatisticamente significativa, quando comparamos os dois grupos (Controle = $0,2491 \pm 0,05$ vs. Dieta = $0,1461 \pm 0,03$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.75\text{min}$), nem quando foi comparado com os respectivos valores basais, na ausência deste antagonista (Figura 17). Também realizamos a comparação da liberação de lactato pelos adipócitos, na presença de ICI 118,551 (50 nM), juntamente com isoprenalina (1000 nM). Os resultados também não foram diferentes entre os dois grupos (Controle = $0,2937 \pm 0,06$ vs. Dieta = $0,2490 \pm 0,05$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.75\text{min}$). Como observado para o ICI 118,551 isolado, a presença da isoprenalina (1000 nM) juntamente com o ICI 118,551 (50 nM) não foi estatisticamente diferente dos valores basais para nenhum dos grupos. (Figura 18).

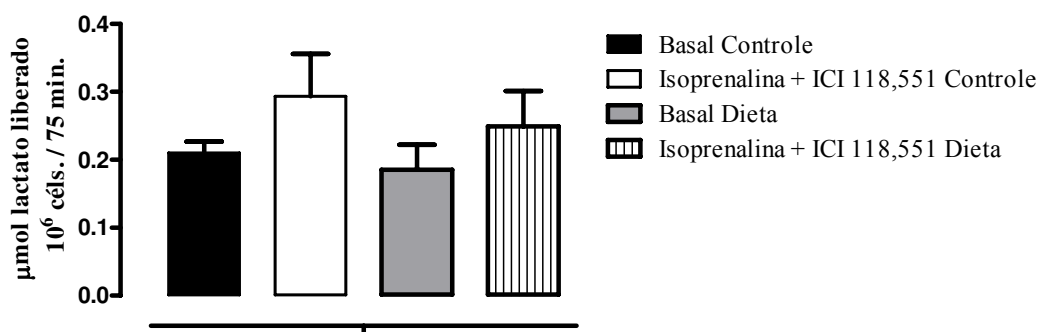
A incubação dos adipócitos com diferentes concentrações de noradrenalina e ICI (50 nM), mostrou que para os ratos do grupo controle, a liberação de lactato foi significativamente maior para as concentrações de 0,01, 0,1, 10, 100 e 1000 nM, quando comparados a concentração basal (BLC = $0,2100 \pm 0,02$ vs. 0,01 nM = $0,3114 \pm 0,05$; 0,1 nM = $0,3222 \pm 0,07$; 10 nM = $0,3352 \pm 0,05$; 100 nM = $0,3646 \pm 0,04$; 1000 nM = $0,3701 \pm 0,09$; $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.75\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 19). No caso dos ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, os valores foram significativamente maiores em comparação ao basal para as concentrações de 1 a 1000 nM (BLD = $0,1854 \pm 0,04$ vs. 1 nM = $0,3996 \pm 0,03$; 10 nM = $0,3488 \pm 0,06$; 100 nM = $0,3386 \pm 0,01$; 1000 nM = $0,3182 \pm 0,03$; $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.75\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 19). Também realizamos a comparação da quantidade de lactato liberada pelos adipócitos na presença de noradrenalina, juntamente com o ICI 118,551 (50 nM), e somente a noradrenalina. Não encontramos diferenças significativas para nenhuma das concentrações de ambos os grupos.

A quantidade de lactato que foi liberada pelos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal, estimulados por diferentes concentrações de noradrenalina, na presença de ICI (50 nM), não foi estatisticamente diferente para nenhuma das concentrações analisadas, na comparação entre os grupos (Figura 19).



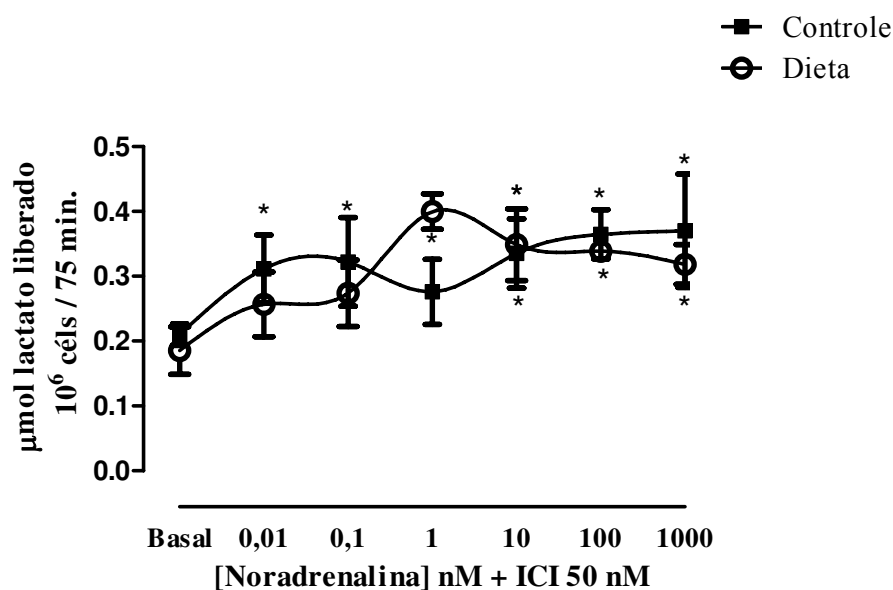
Tratamento	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,2101	0,02	0,1854	0,04
Basal + ICI 118,551 (50 nM)	0,2491	0,05	0,1461	0,03

Figura 17. Liberação basal de lactato na presença ou ausência de ICI 118,551 (50 nM) para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão (n=3-10) ou hiperlipídica (n=5-6). Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$.



Tratamento	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,2101	0,02	0,1854	0,04
Isoprenalina (1000 nM) + ICI 118,551 (50 nM)	0,2937	0,06	0,2490	0,05

Figura 18. Liberação basal e estimulada de lactato na ausência ou presença de isoprenalina (1000 nM) e ICI 118,551 (50 nM) para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=3-10) ou hiperlipídica (n=6-9). Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste *t* de Student, considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$.



[Noradrenalina nM]	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,2101	0,02	0,1854	0,04
0,01	0,3114*	0,05	0,2568	0,05
0,1	0,3222*	0,07	0,2739	0,05
1	0,2761	0,05	0,3996*	0,03
10	0,3352*	0,05	0,3488*	0,06
100	0,3646*	0,04	0,3386*	0,01
1000	0,3701*	0,09	0,3182*	0,03

Figura 19. Liberação de lactato em resposta a diferentes concentrações de noradrenalina juntamente com ICI 118,551 (50 nM) de adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=3-10) ou hiperlipídica (n=3-9). Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. 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.

Apesar de durante muitos anos ter sido considerado um produto sem finalidade, resultante de reações metabólicas, atualmente, sabemos que o lactato é uma fonte importante de energia, por ser um metabólico intermediário, precursor da gliconeogênese. Por muito tempo, o tecido adiposo foi visto somente como um tecido cuja única função era referente ao controle da estocagem de energia, entretanto, estudos aprofundados permitiram compreender outras funções deste tecido, que é passou a ser considerado um órgão endócrino (GIMENO & KLAMAN, 2005; FERRIS & CROWTHER, 2011). Dentre outras funções, vários pesquisadores descreveram o tecido adiposo com um sítio importante para produção de lactato (JANSSON; SMITH; LÖNNROTH, 1990; HAGSTRÖM-TOFT et al., 1997; QVISTH et al., 2007). 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 ratos que fizeram ingesta da dieta padrão ou hiperlipídica.

A produção de lactato pelos adipócitos isolados é resultado da captação de glicose pelas células adiposas que convertem aproximadamente 5-10% desta glicose captada em lactato, no caso de adipócitos pequenos (DiGIROLAMO; NEWBY; LOVEJOY, 1992; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996). Outros estudos mostram que, em adipócitos maiores, este valor pode chegar a 30-40% da glicose captada (CRANDALL et al., 1983). Este lactato produzido é transportado para corrente sanguínea, por meio de transportadores de monocarboxilato (MCTs), da mesma forma que acontece em outros tipos celulares, como as presentes nos músculos esqueléticos (HAJDUCH et al., 2000). Na circulação, o lactato é direcionado para o tecido hepático, onde servirá como substrato para o processo de gliconeogênese em situações de jejum (BROOKS, 2002; CHAMPE & HARVEY, 2002).

Existem relatos na literatura mostrando que as quantidades de lactato produzidas no pelos músculos esqueléticos são muito pequenas, desta forma, o lactato proveniente do tecido adiposo teria importante papel como precursor da gliconeogênese (DiGIROLAMO; NEWBY; HILL, 1989; YKI-JARVINEM; BOGARDUS; FOLEY, 1990).

Considerando esta informação, poderíamos ter elevação da glicemia de acordo com a quantidade de lactato produzida pelos adipócitos, uma vez que estariam liberando mais deste substrato na circulação, o que não observamos. Em nosso estudo identificamos que a captação de glicose pelos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta

da dieta hiperlipídica ao longo de quatro semanas foi significativamente menor que aqueles que fizeram ingesta da dieta padrão em diferentes concentrações de insulina, noradrenalina e para concentração de 1000 nM de isoprenalina. Como estes adipócitos estão realizando menor captação de glicose, seria esperado que a produção de lactato fosse reduzida, comparado aos ratos controle, o que foi verificado por meio de ensaios funcionais com adipócitos isolados.

A incubação de diferentes concentrações de noradrenalina com estes adipócitos foi responsável por aumentar a quantidade de lactato produzida em relação à liberação basal, tanto para o grupo controle, quanto para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica. Na comparação entre os grupos, verificamos aumento significativo da quantidade de lactato liberada pelos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal para concentração de 1 nM de noradrenalina. Para a isoprenalina observamos comportamento semelhante, com liberação de lactato significativamente maior que os valores basais, em algumas concentrações que foram utilizadas, além de maior liberação de lactato para os ratos que fizeram ingesta da ração padrão comparado aos que ingeriram a dieta hiperlipídica na concentração de 1000 nM.

Antigamente, acreditava-se que a produção de lactato pelos adipócitos era mediada exclusivamente pela insulina que promovia a captação de glicose, que então seria convertida em lactato. Entretanto, outros estudos mostraram que os adrenoceptores também estão envolvidos neste processo de captação de glicose. Os adrenoceptores α_1 foram descritos como participantes da captação de glicose em adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1998; CHENG et al., 2000). Também já foi demonstrado que os adrenoceptores β estão envolvidos na captação de glicose e, conseqüentemente, também relacionam-se com a produção de lactato (KASHIWAGI & FOLEY, 1982; LANDSBERG & YOUNG, 1992). Os resultados obtidos em nossos ensaios funcionais confirmaram esta correlação direta entre a captação de glicose e a quantidade de lactato produzida pelos adipócitos isolados.

A noradrenalina é um agonista adrenérgico cuja afinidade é maior pelos adrenoceptores alfa, comparado aos adrenoceptores beta (ARNSTEN, 2000; ARNSTEN, 2011). Conforme descrito anteriormente, após a ligação da noradrenalina ao adrenoceptor α_1 temos um sequência de reações intracelulares que resultam na liberação de cálcio e do DAG, que por sua vez promovem a ativação da proteína quinase C (PKC) (ZHONG & MINNEMAN, 1999). Os lipídeos da via da PLC podem servir de substrato para PI3-K, que desempenha papel fundamental na captação de glicose (KELLY et al., 1992). Já a

isoprenalina é um agonista beta adrenérgico não seletivo, cuja captação de glicose é realizada por variações na concentração de AMPc intracelular, decorrente da quebra do ATP, estimulada pela adenilil ciclase (CREGE, 2007). Como a noradrenalina e a isoprenalina atuam por mecanismos distintos, realizamos a incubação combinada destas substâncias para verificar se existia um efeito somatório para liberação de lactato. Tanto para os ratos que fizeram ingesta da dieta padrão quanto da hiperlipídica, em algumas concentrações este efeito aconteceu quando, comparado a noradrenalina isolada. Para os ratos controle, as diferenças foram significativas para as concentrações de 1 e 1000 nM, sendo que a presença dos dois agonistas promoveu maior liberação do lactato. Já para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica este aumento aconteceu e foi significativo para as concentrações de 0,1 e 1 nM. Possivelmente, esta maior liberação de lactato que foi observada, está relacionada por uma ação mais efetiva destas duas vias por conta da seletividade destes agonistas. Nesta incubação combinada, continuamos tendo maior produção significativa de lactato pelos adipócitos isolados dos ratos do grupo controle em comparação ao grupo que ingeriu a dieta hiperlipídica, que foi observada para as concentrações de noradrenalina de 0,1, 1 e 1000 nM. Estes resultados confirmam que os ratos que fizeram ingesta de dieta hiperlipídica possuem sensibilidade reduzida para noradrenalina e isoprenalina que já havia sido observada nos experimentos de captação de glicose e *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico.

Os ensaios funcionais também foram realizados utilizando antagonistas β adrenérgicos. A incubação foi realizada tanto com o propanolol, antagonista β adrenérgico, quanto com o ICI 118,551, antagonista β_2 .

A incubação foi realizada com diferentes concentrações de noradrenalina (0,01 – 1000 nM), na presença de cada um destes antagonistas, e também com isoprenalina (1000 nM) juntamente com propanolol (1000 nM) ou ICI 118,551 (50 nM).

Tanto para os ratos do grupo controle, quanto os que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, o propanolol conseguiu inibir a produção de lactato pelos adipócitos isolados, estimulada pela isoprenalina (1000 nM). Os valores não foram significativamente diferentes quando comparados a liberação basal (Controle: Basal – $0,1801 \pm 0,03$ vs. Isoprenalina 1000 nM + Propanolol 1000 nM – $0,2870 \pm 0,05 \mu\text{mol}/10^6 \text{ células} \cdot 75 \text{ min.}$; Dieta: Basal – $0,2253 \pm 0,03$ vs. Isoprenalina 1000 nM + Propanolol 1000 nM – $0,3024 \pm 0,04 \mu\text{mol}/10^6 \text{ células} \cdot 75 \text{ min.}$). O mesmo efeito foi verificado para o ICI 118,551, também para os dois grupos (Controle: Basal – $0,2100 \pm 0,02$ vs. Isoprenalina 1000 nM + ICI 118,551 50 nM – $0,2937 \pm$

0,06 $\mu\text{mol}/10^6$ células.75 min.; Dieta: Basal – $0,1854 \pm 0,04$ vs. Isoprenalina 1000 nM + ICI 118,551 50 nM - $0,2490 \pm 0,05$ $\mu\text{mol}/10^6$ células.75 min.). A comparação entre os grupos também não foi diferente para ambos os tratamentos.

Quando realizamos a incubação destes antagonistas com diferentes concentrações de noradrenalina, os resultados foram diferentes da incubação com a isoprenalina isolada. No caso dos ratos pertencentes ao grupo controle, a incubação de noradrenalina com propanolol (1000 nM) promoveu liberação significativamente maior de lactato em comparação ao basal para as concentrações de 0,1 a 100 nM. Já para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica, esta liberação foi significativamente maior, em comparação ao basal, somente para concentração de 100 nM. Conforme descrito anteriormente, a liberação de lactato pelos adipócitos não foi significativamente diferente entre os grupos.

No caso da liberação de lactato estimulada pelas diferentes concentrações de noradrenalina, na presença de ICI 118,551 (50 nM), tivemos diferenças significativas para os ratos do grupo controle em todas as concentrações de noradrenalina, exceto para concentração de 1 nM comparado aos valores basais. Para os adipócitos isolados do tecido adiposo de ratos que ingeriam a dieta hiperlipídica, a liberação de lactato foi significativamente maior em relação aos valores basais para as concentrações de 1 a 1000 nM. Assim como aconteceu para os adipócitos incubados com noradrenalina e propanolol, também não encontramos diferenças significativas para liberação de lactato entre os grupos.

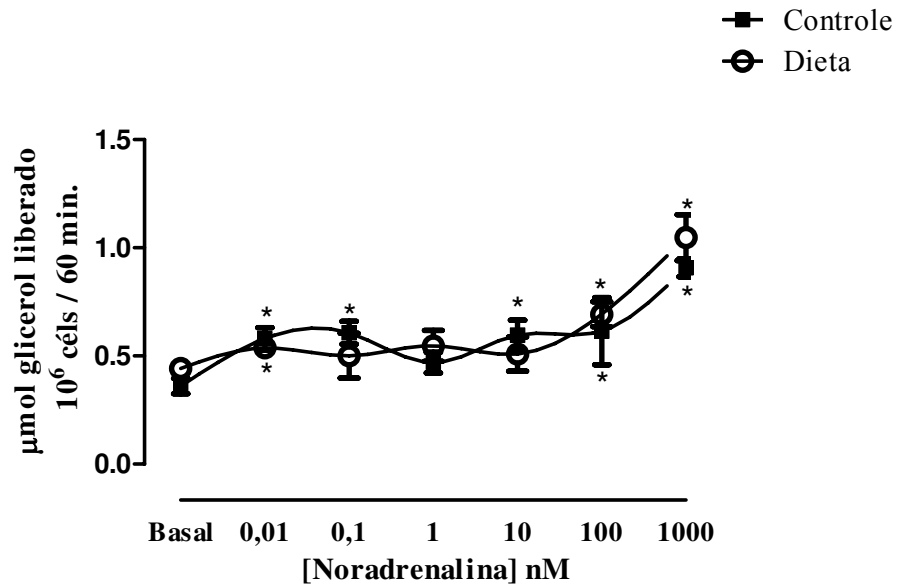
Os resultados encontrados mais uma vez ajudam a entender o processo de captação de glicose estimulada pelos adrenoceptores. A incubação dos antagonistas com a isoprenalina (1000 nM) conseguiu inibir a produção de lactato, quando comparada aos valores basais. Por outro lado, na presença da noradrenalina, observamos liberação significativa de lactato, em relação aos valores basais, tanto para na presença de propanolol, quanto para o ICI 118,551. Conforme descrito previamente, a noradrenalina é uma catecolamina que possui maior afinidade pelo adrenoceptor α (ARNSTEN, 2000; ARNSTEN, 2011). Como os dois antagonistas são específicos para adrenoceptores β , a noradrenalina consegue estimular a liberação do lactato via adrenoceptor α , pelo mecanismo da PKC e desta forma realizar uma produção de lactato que é significativamente maior que os valores basais, mesmo na presença dos antagonistas.

Produção de glicerol pelos adipócitos isolados

Além da análise da produção de lactato pelos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal, também realizamos a determinação da quantidade de glicerol que foi liberada no meio de incubação. A apresentação dos resultados será realizada da mesma forma que descrevemos anteriormente para produção de lactato. Inicialmente, mostraremos os resultados da quantidade de glicerol liberada em cada um dos tratamentos realizados, descritos na metodologia, para cada grupo isoladamente. Em seguida, foi feita a comparação entre os animais que fizeram ingestão da dieta padrão ou hiperlipídica.

A quantidade basal de glicerol produzida pelos adipócitos não foi diferente entre os grupos (BGC = liberação basal de glicerol dos animais controle – $0,3611 \pm 0,04$ vs. BGD = liberação basal de glicerol dos animais que ingeriram dieta hiperlipídica – $0,4426 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/10^6$ células.60min).

A liberação de glicerol, estimulada pela noradrenalina, para os animais do grupo controle é mostrada na Figura 20. A produção de glicerol foi significativamente maior nas concentrações de 0,01, 0,1, 10, 100 e 1000 nM comparado ao valor basal de glicerol que foi liberado (BGC = $0,3611 \pm 0,04$ vs. 0,01 nM = $0,5800 \pm 0,05$; 0,1 nM = $0,6071 \pm 0,05$; 10 nM = $0,5960 \pm 0,07$; 100 nM = $0,6147 \pm 0,16$; 1000 nM = $0,9079 \pm 0,04$ $\mu\text{mol}/10^6$ células.60min, $p < 0,05$). Para os ratos que fizeram ingestão da dieta hiperlipídica ao longo de quatro semanas, encontramos diferenças significativas na liberação de glicerol, comparado ao valor basal produzido, para as concentrações 0,01, 100 e 1000 nM (BGD = $0,4426 \pm 0,01$ vs. 0,01 nM = $0,5375 \pm 0,03$; 100 nM = $0,6925 \pm 0,06$; 1000 nM = $1,0474 \pm 0,11$ $\mu\text{mol}/10^6$ células.60min, $p < 0,05$) (Figura 20). Quando realizamos a comparação entre os ratos que fizeram ingestão da dieta padrão ou hiperlipídica para a liberação de glicerol estimulada pela noradrenalina, não encontramos diferenças estatísticas significativas entre os grupos (Figura 20).

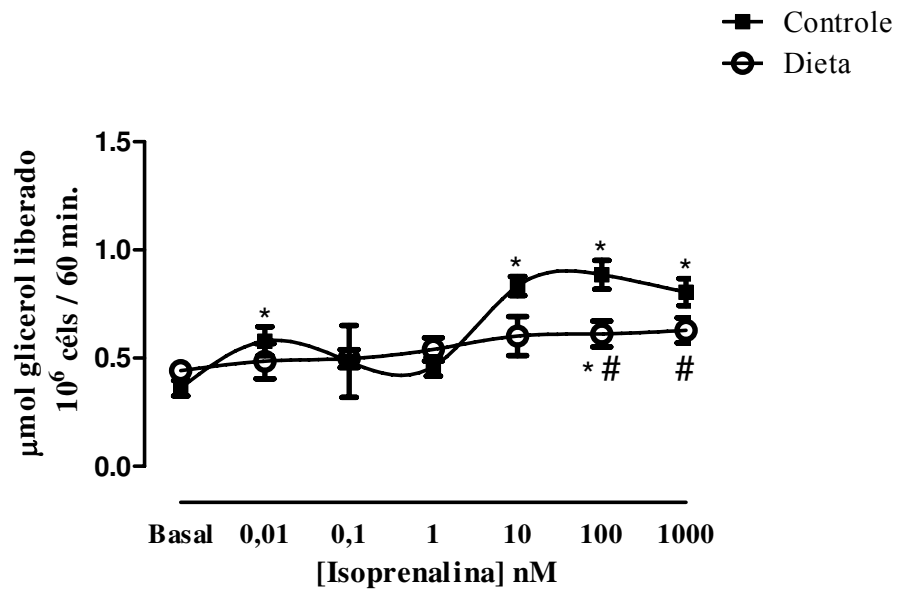


[Noradrenalina nM]	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,3611	0,04	0,4426	0,01
0,01	0,5800 *	0,05	0,5375 *	0,03
0,1	0,6071 *	0,05	0,5012	0,10
1	0,4699	0,05	0,5471	0,07
10	0,5960 *	0,07	0,5093	0,08
100	0,6147 *	0,16	0,6925 *	0,06
1000	0,9079 *	0,04	1,0474 *	0,11

Figura 20. Liberação de glicerol em resposta à diferentes concentrações de noradrenalina para adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingesta da dieta padrão (n=3-7) ou hiperlipídica (n=3-5) por quatro semanas. Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos realizados em triplicata. 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.

A determinação da quantidade de glicerol liberada também foi analisada na presença de diferentes concentrações de isoprenalina. Para os ratos que fizeram ingesta da dieta padrão, na presença deste agonista, tivemos liberação de glicerol significativamente maior para as concentrações de 0,01, 10, 100 e 1000 nM, quando comparado ao valor basal (BGC = $0,3611 \pm 0,04$ vs. 0,01 nM = $0,5788 \pm 0,07$; 10 nM = $0,8332 \pm 0,04$; 100 nM = $0,8857 \pm 0,07$; 1000 nM = $0,8046 \pm 0,06$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 20). Por outro lado, para os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica ao longo de quatro semanas, a estimulação da isoprenalina induziu liberação de glicerol significativa, comparado ao valor basal, somente para concentração de 100 nM (BGD = $0,4426 \pm 0,01$ vs. 10 nM = $0,6123 \pm 0,06$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 20).

Diferente do que observamos quando incubamos os adipócitos com a noradrenalina, no caso da isoprenalina observamos diferenças significativas na comparação entre os grupos. A liberação de glicerol, estimulada por diferentes concentrações de isoprenalina, foi significativamente diferente para as concentrações de 100 e 1000 nM, onde observamos que os ratos do grupo dieta produziram quantidade de glicerol significativamente menor (100 nM; Controle = $0,8857 \pm 0,07$ vs. Dieta = $0,6123 \pm 0,06$; 1000 nM; Controle = $0,8046 \pm 0,06$ vs. Dieta = $0,6287 \pm 0,06$; $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 21).

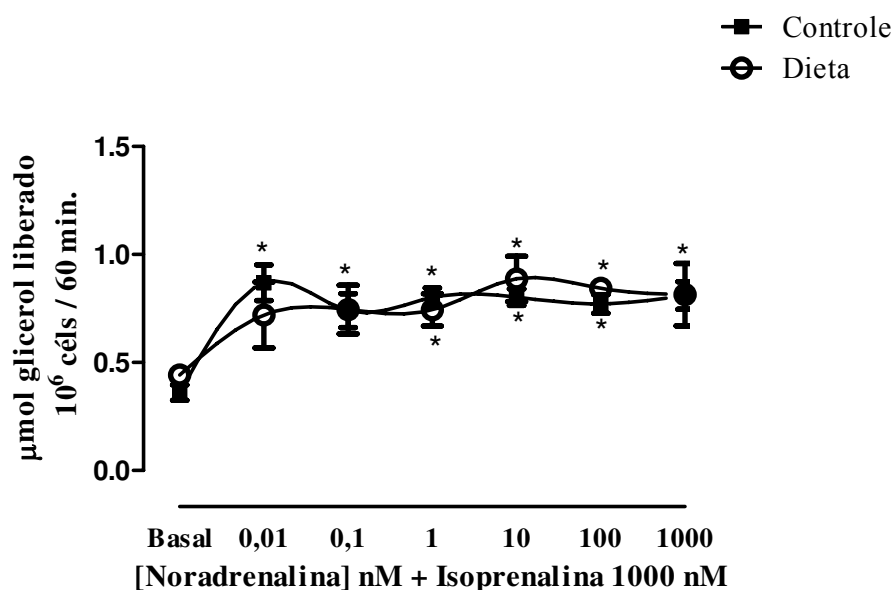


[Isoprenalina nM]	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,3611	0,04	0,4426	0,01
0,01	0,5788 *	0,07	0,4860	0,08
0,1	0,4845	0,17	0,4981	0,04
1	0,4612	0,04	0,5404	0,05
10	0,8332 *	0,04	0,6020	0,09
100	0,8857 *	0,07	0,6123 *#	0,06
1000	0,8046 *	0,06	0,6287#	0,06

Figura 21. Liberação de glicerol em resposta à isoprenalina de adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=3-7) ou hiperlipídica (n=3-7) por quatro semanas. Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. 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; # $p < 0,05$ controle vs. dieta para mesma concentração.

Além da incubação destes agonistas isoladamente, também realizamos a incubação de diferentes concentrações de noradrenalina juntamente com isoprenalina (1000 nM). Observamos liberação de glicerol significativamente maior para todas as concentrações de noradrenalina que foram utilizadas (0,01 a 1000 nM), para os ratos que fizeram ingesta da dieta padrão, comparado ao seu valor basal (BGC = $0,3611 \pm 0,04$ vs. 0,01 nM = $0,8691 \pm 0,08$; 0,1 nM = $0,7401 \pm 0,08$; 1 nM = $0,8014 \pm 0,04$; 10 nM = $0,8029 \pm 0,04$; 100 nM = $0,7717 \pm 0,04$; 1000 nM = $0,8106 \pm 0,06$ $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 22). Já nos ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica durante quatro semanas, a mesma condição, apresentou diferenças significativas em relação ao basal, somente para as concentrações de 1 a 100 nM (BGD = $0,4426 \pm 0,01$ vs. 1 nM = $0,7438 \pm 0,08$; 10 nM = $0,8875 \pm 0,11$ 100 nM = $0,8439 \pm 0,04$; $\mu\text{mol}/10^6\text{células}.60\text{min}$, $p < 0,05$) (Figura 22). Também verificamos se existia um efeito somatório da presença de noradrenalina e isoprenalina para liberação de glicerol. Comparamos esta liberação estimulada pelas diferentes concentrações de noradrenalina juntamente com a isoprenalina (1000 nM), com as concentrações isoladas de noradrenalina. No caso dos animais que fizeram ingesta da dieta padrão, foi verificado diferenças significativas para as concentrações de 0,01, 1 e 10 nM, sendo que a presença dos dois agonistas promoveu maior liberação do glicerol. Já para os animais que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica este aumento aconteceu e foi significativo somente para a concentração 10 nM.

Quando comparamos os dois grupos, a quantidade de glicerol que foi liberada pelos adipócitos isolados, na presença de noradrenalina e isoprenalina (1000 nM), não foi significativamente diferente para nenhuma das concentrações de noradrenalina utilizadas (Figura 22).



[Noradrenalina nM]	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Basal	0,3611	0,04	0,4426	0,01
0,01	0,8691 *	0,08	0,7201	0,15
0,1	0,7401 *	0,08	0,7456	0,11
1	0,8014 *	0,04	0,7438 *	0,08
10	0,8029 *	0,04	0,8875 *	0,11
100	0,7717 *	0,04	0,8439 *	0,04
1000	0,8106 *	0,06	0,8148	0,14

Figura 22. Liberação de glicerol em resposta a diferentes concentrações de noradrenalina juntamente com isoprenalina (1000 nM) de adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos que fizeram ingestão da dieta padrão (n=5-7) ou hiperlipídica (n=3-6) por quatro semanas. Os valores representam a média \pm EPM de experimentos distintos, realizados em triplicata. 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.

A reserva de gordura do tecido adiposo branco é a principal fonte energética dos mamíferos. Quando temos aumento da necessidade energética do organismo, através da hidrólise, os estoques de triacilgliceróis são mobilizados resultando em ácidos graxos livres e glicerol (LASS et al., 2011). Em nosso estudo, analisamos a função lipolítica por meio da determinação da concentração de glicerol liberada no meio de incubação. Esta produção de glicerol é determinada por vários fatores, como o tamanho do adipócitos (LAURENCIENE et al., 2011), gênero (LEY et al., 1992; LLADÓ et al., 2002) e região do tecido adiposo (LAFONTAN & BERLAN, 2003; KOUTSARI et al., 2011)

Além disso, uma gama muito extensa de efetores lipolíticos e antilipolíticos está relacionada com o controle dos estoques de lipídeos em diferentes tecidos (HOLM, 2003; LANGIN, 2006). Entre estes efetores temos a participação de hormônios, citocinas e adiponectinas (ZECHNER et al., 2009).

No caso do tecido adiposo, a lipólise é regulada principalmente pelas catecolaminas, cuja atuação é mediada via adrenoceptores beta (LAFONTAN & BERLAN, 1993). Desta forma, realizamos a incubação dos adipócitos isolados com a noradrenalina. Nossos resultados demonstraram que a liberação de glicerol foi significativamente maior que os valores basais tanto no grupo controle, quanto nos animais tratados com a dieta hiperlipídica. Conforme descrito anteriormente, o mecanismo de funcionamento dos adrenoceptores depende de cada tipo que está sendo estimulado. Para realizar a lipólise, a interação dos adrenoceptores beta com a adenilil ciclase é realizada via proteína G estimulatória (G_s) (GILMAN, 1987). A ativação da proteína G vai promover o aumento da síntese intracelular de AMPc, que por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA). Quando a proteína quinase A encontra-se ativa, temos a fosforilação da lipase-hormônio-sensível (HSL) e das perilipinas (JOHNSON; JANNE; BERNARD, 2000; HOLM, 2003), que realizam a hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (CLIFFORD et al., 2000).

A ativação desta via foi comprovada em nossos experimentos, já que o estímulo da noradrenalina conseguiu promover a lipólise, via adrenoceptores beta, quando comparado aos valores basais. Estes resultados estão de acordo com outros resultados da literatura e estudos prévios realizados em nosso laboratório, que mostraram maior liberação de glicerol, estimulada pelas catecolaminas, tanto para os animais que fizeram ingesta da dieta padrão, quanto da dieta hiperlipídica, quando comparada aos valores basais (SUSINI; LAVAU; HERZOG, 1979; TEPPERMAN; DEWITT; TEPPERMAN, 1986; WOLF-NUNES, 2004). A

comparação da liberação de glicerol, estimulada por diferentes concentrações de noradrenalina, não foi diferente entre os dois grupos analisados. Este resultado é diferente de outros trabalhos encontrados na literatura assim como foi observado no trabalho de Wolf-Nunes (2004) que desenvolveu sua pesquisa em nosso laboratório. Wolf-Nunes (2004) verificou que os animais que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica ao longo de seis semanas possuíram menor liberação de glicerol, quando comparada a resposta dos adipócitos isolados do grupo controle. De acordo com a autora, uma possibilidade para isto seria o aumento atividade da lipoproteína lipase (LPL), cuja função é realizar a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos, que serão captados pelos adipócitos e formarão novos triacilgliceróis, que então são armazenados.

Neste mesmo estudo, foi verificado que a quantidade de gordura acumulada nos pâncreos adiposos epididimais foi significativamente maior nos ratos que ingeriram a dieta hiperlipídica, comparado aos que ingeriram a dieta padrão, o que ajudaria sustentar esta hipótese. Entretanto, estudos recentes, ainda não publicados pelo nosso laboratório, não demonstram elevação nas quantidades de LPL dos adipócitos de animais que ingeriam dieta hiperlipídica ao longo de quatro semanas, portanto, é de fundamental relevância analisar o tempo de exposição ao ambiente hiperlipídico para avaliar as alterações. Ou seja, com apenas duas semanas a mais de ingesta da dieta hiperlipídica, outras alterações podem ser evidenciadas.

Outro fator que poderia estar envolvido neste processo é a adenosina, que é uma molécula aparentemente produzida por todos os tecidos do organismo (VERNON; FINLEY; WATT, 1990). No tecido adiposo, os efeitos da adenosina foram demonstrados por Dole (1961), que atribuiu a esta substância um importante efeito antilipolítico. A adenosina consegue reduzir a formação de AMPc e, conseqüentemente, reduz a lipólise (OHISALO; RANTA; HUHTANIEMI, 1984). Considerando esta hipótese, seria necessário investigar se existe algum aumento na quantidade intracelular da adenosina ou temos alteração na expressão dos receptores para os ratos que realizaram ingesta da dieta hiperlipídica, levando em conta sempre, o tempo de exposição à dieta. A quantidade de AMPc formada também é apontada como sendo um dos fatores determinantes da produção de glicerol. No estudo de Tepperman, Dewitt e Tepperman (1986), discute-se a possibilidade dos adipócitos de ratos que ingeriram dieta hiperlipídica formarem quantidades reduzidas de AMPc e, por isso, estariam produzindo menos glicerol que os animais controle, sendo esta hipótese para os ratos hiperlipidêmicos que apresentaram redução na lipólise basal, bem como aumento significativo

no peso dos pânuculos epididimais, após serem submetidos a dieta hiperlipídica ao longo de seis semanas.

Quando realizamos a incubação dos adipócitos com diferentes concentrações de isoprenalina, também observamos liberação de glicerol significativa, comparado aos valores basais. A isoprenalina atua via adrenoceptores beta, de forma não seletiva, atuando em β_1 , β_2 e β_3 e ativando o mecanismo descrito acima para realizar a lipólise. Diferente da noradrenalina, que também possui afinidade pelos adrenoceptores alfa, a isoprenalina é seletiva para os adrenoceptores beta, desta forma, a maior produção de glicerol, estimulada por esta substância seria esperada e foi confirmada para os dois grupos. Um fato interessante, é que para este agonista, observamos diferenças significativas entre os grupos, sendo que os adipócitos isolados de ratos do grupo submetido à dieta ao longo de quatro semanas apresentaram liberação de glicerol significativamente menor quando comparado aos do grupo controle. Estes resultados mostram comportamento similar aos obtidos em outros trabalhos já citados (SUSINI; LAVAU; HERZOG, 1979; TEPPERMAN; DEWITT; TEPPERMAN, 1986; WOLF-NUNES, 2004). Conforme informado anteriormente, algumas hipóteses podem estar relacionadas com esta liberação de glicerol aumentada para os animais do grupo controle, como a via da adenosina e quantidade de AMPc formada uma vez que neste grupo a quantificação da expressão da LPL foi realizada e não houve diferença significativa.

A incubação combinada de diferentes concentrações de noradrenalina com isoprenalina (1000 nM) também promoveu estimulação significativa nas quantidades de glicerol produzidas pelos adipócitos em relação aos valores basais. Este fato foi observado tanto para o grupo controle, quanto para os animais que ingeriram dieta hiperlipídica. Assim como ocorreu para noradrenalina isolada, a incubação combinada destas substâncias não foi diferente, na comparação entre os dois grupos. A produção de glicerol nesta incubação combinada foi significativamente maior, quando comparada a algumas concentrações de noradrenalina isolada tanto no caso dos animais pertencentes ao grupo controle, quanto para o grupo que ingeriu a dieta hiperlipídica. O resultado chama a atenção principalmente se considerarmos que a noradrenalina possui afinidade elevada pelos adrenoceptores alfa, como o α_2 , cujo efeito é antilipolítico.

Ao contrário do que acontece com a maior parte dos adrenoceptores β , os adrenoceptores α_2 estão acoplados com uma proteína G inibitória (G_i), que inibe a ação da adenilil ciclase, promovendo diminuição da ativação da PKA, a consequência deste processo

é a redução da atividade lipolítica (GALITZKY et al., 1993, LANGIN; HOLM; LAFONTAN, 1996). Se este efeito tivesse acontecido de forma expressiva, a resultante do processo estímulo/inibição da lipólise poderia gerar menor produção de glicerol pelos adipócitos isolados. Entretanto, nossos resultados mostraram que o estímulo dos adrenoceptores β é predominante, resultando em liberação significativa de glicerol, comparado a noradrenalina isolada, que foi observada para algumas concentrações. O estímulo concomitante destes agonistas adrenérgicos fez com que as diferenças entre os grupos, verificadas para algumas concentrações isoladas de isoprenalina, não acontecesse, assim como ocorreu na incubação com a noradrenalina isolada. Este resultado pode sugerir que a presença da noradrenalina, ligando também aos adrenoceptores alfa, esteja de alguma forma modificando a quantidade de glicerol produzida e fazendo as diferenças entre os grupos deixarem de existir.

Morfometria dos adipócitos epididimais

Em nosso estudo analisamos a morfometria dos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal para os animais que ingeriram a dieta padrão ou a dieta hiperlipídica. Foi realizada a determinação da área e do diâmetro dos adipócitos isolados. Para as duas análises não encontramos diferenças significativas entre os grupos (Área: Controle = $4774,38 \pm 312,26$ vs. Dieta = $4867,99 \pm 186,35 \mu\text{m}^2$; Diâmetro: Controle = $76,13 \pm 2,35$ vs. Dieta = $76,09 \pm 1,51 \mu\text{m}$). Os resultados estão apresentados na figura 23. Estes dados estão de acordo com resultados não publicados de nosso laboratório, onde nenhuma diferença foi identificada neste depósito de gordura analisado nos ratos que ingeriram dieta hiperlipídica por quatro semanas.

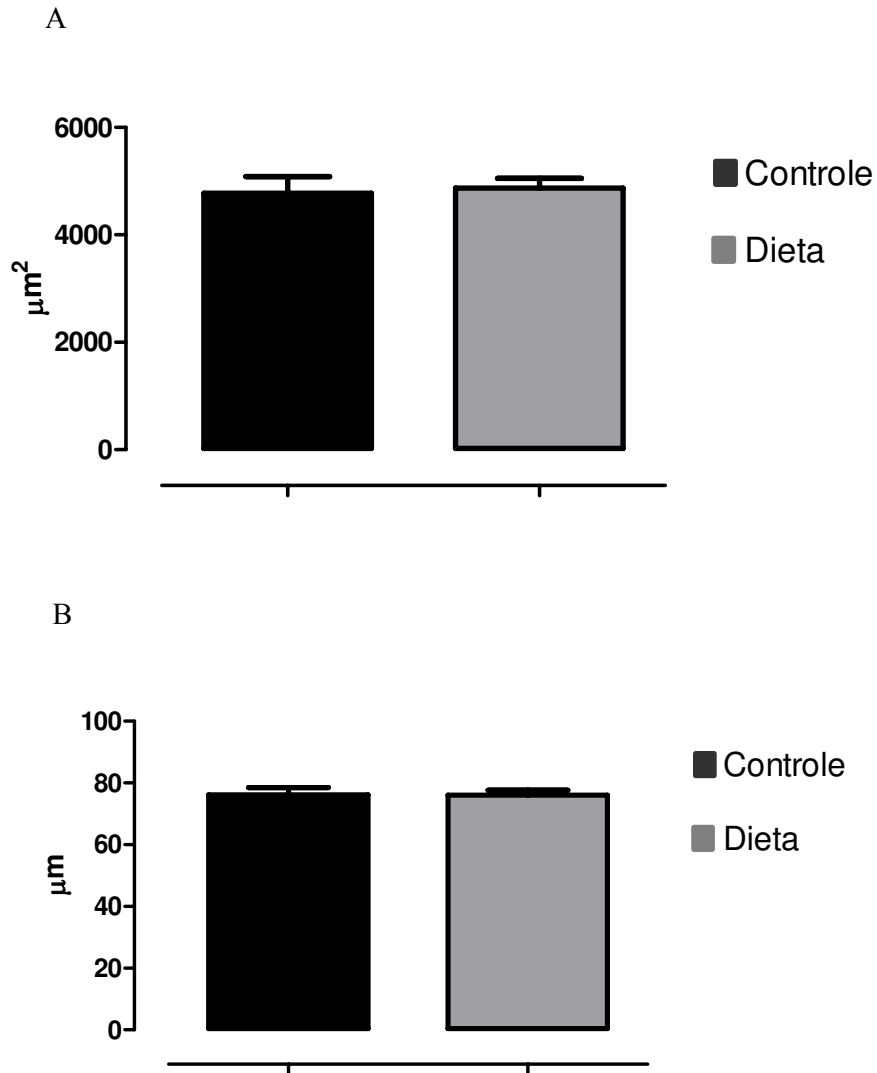
A função metabólica primária do tecido adiposo é realizar o estoque do excesso de energia na forma de triacilgliceróis. Esta energia é derivada principalmente de lipídeos circulantes, que são captados pelos adipócitos via LPL (LANGOUCHE et al., 2010). Uma menor parte do estoque de triacilgliceróis nos adipócitos é proveniente de carboidratos circulantes que sofrem lipogênese (MARIN et al., 1992).

As alterações nos tamanhos dos adipócitos são decorrentes da resultante entre a lipogênese e a lipólise, que são os processos típicos destas células. A variação na intensidade das vias lipolíticas e lipogênicas está relacionada com a necessidade de incorporação ou liberação de lipídeos que dependem de outros fatores como o estado nutricional do indivíduo, do seu gasto energético e da influência hormonal (QUEIROZ et al., 2009). O aumento no tamanho dos adipócitos faz com que em determinado momento tenhamos esgotamento da capacidade de estocagem de gordura, tornando-os mais lipolíticos, o que promoveria elevação nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (DeFRONZO, 2004). Como descrito, nossos resultados não demonstraram diferenças significativas na área e diâmetro dos adipócitos isolados. Outros trabalhos na literatura também não verificaram alterações no tamanho destas células de animais que fizeram ingesta de dieta hiperlipídica. Gollisch e colaboradores (2009) trabalharam com adipócitos isolados de ratas da linhagem Sprague-Dawley, que ingeriram dieta hiperlipídica por quatro semanas. Também não foi observado aumento no tamanho dos adipócitos retirado do tecido adiposo visceral, comparado com animais que fizeram ingesta de dieta padrão. Por outro lado, em alguns trabalhos foi identificado aumento no tamanho dos adipócitos para animais que ingeriram dieta hiperlipídica, como por exemplo, camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 11

semanas que tiveram aumento no tamanho dos adipócitos comparado ao grupo controle (TAKEMURA; OKUBO; SONOYAMA, 2010). Gaidhu et al. (2010) realizou tratamento de ratos com dieta hiperlipídica por oito semanas e identificou aumento no diâmetro dos adipócitos tanto para o tecido adiposo epididimal, quanto para os provenientes do tecido inguinal. Em estudos anteriores, Wolf-Nunes (2004) observou aumento significativo no peso do pânículo adiposo epididimal em ratos submetidos à dieta hiperlipídica por seis semanas. Neste estudo não foram feitas análises morfométricas para averiguar se o aumento do tamanho estava relacionado a aumento no número ou no tamanho dos adipócitos.

Além do aumento no tamanho dos adipócitos, o número de células também pode ser avaliado. O processo de hiperplasia no tecido adiposo é dependente da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos. Os pré-adipócitos fazem parte de um reservatório de células-tronco mesenquimais, que constituem entre 15 e 50 % do tecido adiposo, e são capazes de se diferenciar em resposta a agentes extracelulares. Esta informação é importante, principalmente pelo fato de que durante muito tempo foi proposto que os adipócitos de humanos adultos teriam um número fixo, sendo que as mudanças no tecido adiposo seriam decorrentes de alterações no volume de gordura da célula. Atualmente, sabe-se que esta capacidade de gerar novas células persiste durante toda vida (QUEIROZ et al., 2009).

No trabalho de Wolf-Nunes (2004), os ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica por seis semanas tiveram aumento significativo no peso do pânículo adiposo epididimal, comparado aos animais controle. Conforme citado anteriormente, no estudo de Gollisch e colaboradores (2009), as ratas Sprague-Dawley que ingeriram dieta hiperlipídica por quatro semanas, não apresentaram diferenças significativas no tamanho dos adipócitos epididimais, comparado aos animais que ingeriram a dieta padrão, entretanto, o número de células neste tecido foi significativamente maior para os animais tratados com a dieta hiperlipídica. Nos nossos estudos tanto de quatro como seis semanas de deita não avaliamos o número de adipócitos por área.



	Controle		Dieta	
	Média	EPM	Média	EPM
Área	4774,38	312,26	4867,99	186,35
Diâmetro	76,13	2,35	76,09	1,51

Figura 23. Morfometria de adipócitos isolados do pâncreo adiposo da região epididimal de ratos controle e de ratos ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de quatro semanas ($n = 5$). Foi avaliada a área (A) e o diâmetro (B) dos adipócitos isolados. Dados apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada com o teste t de Student.

Parâmetros cardiovasculares

Além das alterações metabólicas descritas anteriormente, realizamos análise de parâmetros cardiovasculares, que também podem sofrer alterações devido à ingesta de dieta hiperlipídica. Na tabela 3, verificamos o comportamento de parâmetros eletrocardiográficos dos animais que fizeram a ingesta da dieta hiperlipídica ou padrão. Os parâmetros eletrocardiográficos analisados neste estudo foram: Intervalos QT, ajustados em função da frequência cardíaca (QTc), intervalos RR, frequência cardíaca (FC) e intervalos QRS.

A análise do eletrocardiograma não mostrou diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros verificados, na comparação dos ratos que ingeriram dieta hiperlipídica por quatro semanas com o grupo controle: Frequência cardíaca: Controle – $338,8 \pm 9,31$ vs. Dieta – $353,3 \pm 37,07$ bpm; Intervalos QTc: Controle – $96,50 \pm 12,11$ vs. Dieta – $70,50 \pm 8,15$ ms; Intervalo RR: Controle – $178,0 \pm 5,01$ vs. Dieta – $176,5 \pm 19,86$ ms; Intervalo QRS: Controle – $15,1 \pm 0,85$ vs. Dieta – $16,0 \pm 1,63$ ms (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros eletrocardiográficos em ratos controle (C, n=6) ou submetidos a quatro semanas de tratamento com dieta hiperlipídica (D, n=5). Foram analisados os intervalos QT, ajustados em função da frequência cardíaca (QTc, ms), intervalos RR (ms), frequência cardíaca (FC, batimentos por minuto, bpm), intervalos QRS (ms). Dados apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada com o teste *t* de Student.

Grupo	QTc (ms)	RR (ms)	FC (bpm)	QRS (ms)
C	96,50 \pm 12,11	178,0 \pm 5,01	338,8 \pm 9,31	15,1 \pm 0,85
D	70,50 \pm 8,15	176,5 \pm 19,86	352,3 \pm 37,07	16,0 \pm 1,63

Já na tabela 4, são apresentados os resultados para histologia dos cardiomiócitos dos animais que fizeram ingesta da dieta padrão ou hiperlipídica por quatro semanas.

O valor da área dos cardiomiócitos dos ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica por quatro semanas foi significativamente maior, comparado aos ratos que ingeriram a dieta padrão (Controle – $3613 \pm 255,7$ vs. Dieta – $5224 \pm 304,9 \mu\text{m}^2$).

Tabela 4. Valores da área de cardiomiócitos (μm^2) de ratos controle (C, n=4) ou submetidos ao tratamento com quatro semanas de dieta hiperlipídica (D, n=10). Dados apresentados como média \pm EPM. * $P < 0,05$ D vs C; teste t de Student.

Grupo	Área dos Cardiomiócitos (μm^2)
C	$3613 \pm 255,7$
D	$5224 \pm 304,9^*$

A obesidade é uma condição patológica, na qual o excesso de gordura corporal é responsável por desencadear muitos problemas de saúde, como por exemplo, alterações cardiovasculares (HASLAM & JAMES, 2005; NOEMAN; HAMOODA; BAALASH, 2011). A utilização de dietas hiperlipídica é uma das formas de se induzir a obesidade nos ratos, para estudar as alterações cardiovasculares (Von DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006). O eletrocardiograma (ECG) é um exame não invasivo, desenvolvido por Willen Einthoven em 1902, que verifica o comportamento da atividade elétrica do coração. É amplamente utilizado até hoje como instrumento de auxílio no diagnóstico de cardiomiopatias (PIMENTEL, 2006). Muitos estudos mostraram que distúrbios metabólicos podem desencadear problemas cardiovasculares e, conseqüentemente, alterações no ECG (KIZILBASH et al., 2006; LIN et al., 2008; KONES, 2010; TANINDI et al., 2011).

Nossos resultados não mostraram diferenças significativas na análise dos parâmetros de eletrocardiograma descritos acima, quando comparamos os dois grupos. Diversos fatores são capazes de influenciar o registro do ECG, como o tipo de anestésico, a posição do animal durante o registro, bem como outras variáveis que incluem características dos próprios animais como idade, peso e sexo (RAMOS, 2010).

Exceção feita às variáveis temporais, a eletrocardiografia em ratos apresenta comportamento semelhante aos de seres humanos, entretanto, algumas diferenças devem ser consideradas (PIMENTEL, 2006). No trabalho de Sambhi e White (1960), foi demonstrado que, em ratos, o segmento ST é curto ou até mesmo ausente, sendo que a onda T é normalmente positiva e acompanha em direção contínua a onda S. Na ausência de doenças, a análise da derivação I do ECG, muitas vezes, não permite a identificação da onda Q, que eventualmente pode ser identificada na derivação aVL. Já a onda R pode ser identificada em todas as derivações do ECG (SAMBHI & WHITE, 1960).

A disposição anatômica do coração de ratos também é semelhante a dos seres humanos, de forma que os ventrículos direito e esquerdo encontram-se em posição anterior e posterior do coração, sendo que a despolarização cardíaca é iniciada do lado esquerdo, deslocando-se para o direito e são de baixa amplitude. Para estes animais, o eixo elétrico ventricular está disposto na posição vertical, mostrando o posicionamento do ápice cardíaco próximo da linha média esternal, entre +60 e +90 graus (RAMOS, 2010). Apesar de não determinado neste estudo, os valores do eixo podem ser determinados utilizando-se como parâmetros o complexo QRS e onda T.

Os resultados obtidos em nosso estudo, em que não verificamos alterações em parâmetros de ECG na comparação entre os grupos, também foram encontrados por Rodrigues (2009). Ratos Wistar que ingeriram dieta hiperlipídica por quatro semanas não apresentaram diferenças estatísticas significativas para frequência cardíaca, intervalo QT e intervalo QT ajustado em função da frequência cardíaca (QTc), quando comparados aos animais que ingeriram dieta padrão. Por outro lado, neste mesmo estudo, foi encontrado que o eixo elétrico ventricular dos animais que ingeriram a dieta hiperlipídica apresentou desvio para esquerda, o que é um indicio de remodelamento ventricular, caracterizando hipertrofia cardíaca. Esta hipertrofia muitas vezes é consequência da hipertensão arterial e é um fator de risco independente para o desenvolvimento da falência cardíaca (PATTERSON et al., 2011). O processo de hipertrofia ventricular pode ser consequência de uma adaptação fisiológica ou é desencadeado por conta de alterações estruturais e funcionais no coração, sendo importante determinar qual condição está promovendo esta hipertrofia, já que o aumento da massa muscular cardíaca pode ser indicativo de distúrbios que podem levar, por exemplo, a morte súbita (WILSON et al., 2011). De acordo com Dhingra e colaboradores (2005), o aumento da massa ventricular cardíaca pode ser determinado pelo aumento na amplitude do complexo QRS. Apesar de não encontrarmos diferenças na comparação entre os grupos para este complexo, outros resultados que serão discutidos na sequência, identificaram aumento na massa muscular cardíaca.

No trabalho de Rodrigues (2009), a análise da espessura dos cardiomiócitos não apresentou diferenças na comparação entre os grupos controle e hiperlipídico, o que seria esperado por conta da alteração no eixo ventricular. Segundo os autores, uma hipótese para modificação no eixo ventricular seriam alterações na estrutura cardíaca, que foi sugerida devido ao acúmulo de gordura, que ocupou 34% da área total no ventrículo esquerdo, bem como a existência de processo inflamatório no miocárdio, identificado pela presença de infiltrado leucocitário que ocupou 9% da área total.

Outro parâmetro do ECG avaliado foi o intervalo QT ajustado em função da frequência cardíaca (QTc), que está relacionado com a duração da atividade elétrica do ventrículo, determinada pelas fases de despolarização e repolarização (PAN et al., 2011). Este parâmetro eletrocardiográfico é indicativo de arritmias nos ventrículos, principalmente em pacientes com distúrbios coronarianos, falência cardíaca congestiva e de morte súbita (BARR et al., 1994; ZAREBA; MOSS; LeCESSIE, 1994; PSHENICHNIKOV et al., 2008). Por conta destas associações, a análise do intervalo QTc é importante, já que é um método não invasivo

que permite detectar padrões anormais na repolarização ventricular (LOPES et al., 2006). Conforme relatado anteriormente, nossos resultados não apresentaram alterações significativas no intervalo QT.

A frequência cardíaca também não sofreu alterações significativas na comparação entre os grupos. Este resultado também já foi observado em outros estudos descritos na literatura. Jeckel et al. (2011) realizou tratamento de ratos da linhagem Sprague-Dawley com dieta hiperlipídica por 32 semanas. Após este período, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas, comparado ao grupo controle que fez ingestão da dieta padrão. Por outro lado, a mudança na dieta ingerida pode promover alterações na frequência cardíaca, conforme demonstrou Meral e Kacmaz (2003). Neste estudo, os autores demonstraram que pacientes diabéticos, após realizar dieta de restrição calórica por dois meses, tiveram redução significativa da frequência cardíaca, comparado aos valores antes de iniciar o tratamento. Nesta mesma pesquisa, outros parâmetros eletrocardiográficos analisados não sofreram alterações significativas. Por conta destas divergências é necessário realizar novas pesquisas para analisar o comportamento da frequência cardíaca em situações de ingestão de dietas hiperlipídicas. Outras informações acerca do comportamento da frequência cardíaca serão apresentadas posteriormente.

Além da análise destes parâmetros eletrocardiográficos, realizamos em nosso estudo a medição da área de cardiomiócitos a fim de identificar possível quadro de hipertrofia cardíaca. Nossos resultados mostraram diferenças significativas entre os animais que fizeram ingestão da dieta hiperlipídica por quatro semanas, comparado ao controle. Outros estudos na literatura também indicam tal achado, entretanto o tempo de administração de dieta é superior. O aumento significativo na área dos cardiomiócitos para o grupo tratado com dieta hiperlipídica, também já foi identificado em outros estudos da literatura. Os animais da linhagem Sprague-Dawley, que ingeriram a dieta hiperlipídica por 32 semanas tiveram aumento significativo nesta área (JECKEL et al., 2011). Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 24 semanas, também mostraram aumento significativo na área dos cardiomiócitos, comparado aos que fizeram ingestão da dieta padrão (FANG et al., 2008). Singh et al. (2010) realizaram tratamento de ratos Wistar durante 12 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, associada à constrição parcial da aorta abdominal, e verificaram aumento significativo no diâmetro dos cardiomiócitos destes animais.

Estudos recentes têm sugerido que o processo de hipertrofia cardíaca é decorrente de alterações intracelulares nos cardiomiócitos, como a via da mTOR (*mammalian target of rapamycin*). A mTOR desempenha papel importante na integração da resposta celular ao estado nutricional que incluem a quantidade ATP intracelular formada e as concentrações de aminoácidos e glicose (JACINTO, 2008). A Akt é responsável por ativar a via mTOR, que promovendo aumento da síntese protéica, leva a hipertrofia cardíaca (GLAZER et al., 2009). No trabalho de Glazer e colaboradores (2009), foi demonstrado em porcos, que a hipercolesterolemia, também detectada nos ratos que fizeram ingesta da dieta hiperlipídica em nosso trabalho, é capaz de ativar a via da mTOR, além de outros marcadores envolvidos no processo hipertrofia cardíaca. Se esta via também está mais expressada no caso destes ratos que ingeriam a dieta hiperlipídica, é um fator que pode ser investigado em estudos futuros.

Além desta via, outros estudos também mostraram que a hipertrofia dos cardiomiócitos podem ser desencadeadas por vias de sinalização da insulina, alteração nas concentrações de adiponectinas, como a leptina, ou na atividade do receptor proliferador-ativador de peroxissomos (PPAR) (DeBOSCH et al., 2006; SHARMA et al., 2007). O aumento das concentrações plasmáticas de insulina frequentemente está associado à hipertensão e outras doenças como a síndrome metabólica. Como já informado anteriormente, a insulina atua desencadeando a formação de PI3-K, que por sua vez realiza a ativação da Akt, promovendo o estímulo da via mTOR descrito acima. Além disso, a Akt também é capaz de suprimir a degradação protéica, por meio da inativação FOXO (*forkhead dependent transcription factors*), que realiza a proteólise, assim a insulina seria capaz de influenciar no processo de hipertrofia cardíaca (SHARMA et al., 2007). A participação das adiponectinas também está relacionada com o mecanismo da PI3-K e consequente ativação da via da Akt. A expressão de genes nos cardiomiócitos e sua hipertrofia também podem ser ativadas pelo aumento da atividade do PPAR. Este receptor apresenta elevação de sua atividade, quando temos maior disponibilidade de ácidos graxos, que pode acontecer com a ingesta de dieta hiperlipídica (GILDE et al., 2003).

Wolf-Nunes (2004) mostrou que ratos jovens que fizeram ingesta de dieta hiperlipídica por seis semanas tiveram aumento significativo das concentrações plasmáticas de insulina, comparado as concentrações dos animais que ingeriram a dieta padrão. Conforme discutido anteriormente, os animais que realizaram ingesta da dieta hiperlipídica tiveram redução na quantidade de glicose captada pelos adipócitos isolados, sugerindo resistência à insulina. Se pensarmos que este hormônio é capaz de promover hipertrofia cardíaca, a

princípio, ficaria contraditório atribuir este processo ao aumento da concentração do hormônio. Entretanto, existem estudos na literatura realizados com humanos que mostraram que a resistência à insulina, em pacientes diabéticos, é menor na musculatura cardíaca (PATERNOSTRO et al., 1996; ABEL, 2005).

Desta forma, se existe resistência à insulina nos adipócitos, as concentrações plasmáticas deste hormônio e dos ácidos graxos livres ficarão elevadas, o que pode aumentar a atividade da via de sinalização da insulina e da PPAR no coração, favorecendo a hipertrofia cardíaca.

Miotto (2006) realizou estudo em nosso laboratório com ratos que fizeram dieta hiperlipídica por seis semanas e demonstrou que a massa ventricular esquerda ($C = 546,6 \pm 23,9$ vs. $D = 653,8 \pm 28,2$ mg, $p < 0,05$) a espessura da parede ventricular esquerda ($C = 11,5 \pm 0,1$ vs. $D = 15,1 \pm 0,5$ mm, $p < 0,05$) e o diâmetro interno do ventrículo esquerdo ($C = 28,8 \pm 0,2$ vs. $D = 20,6 \pm 0,3$ mm, $p < 0,05$) apresentaram diferenças significativas na comparação entre os grupos. Estes resultados comprovam a instalação do quadro de hipertrofia cardíaca pela ingestão da dieta hiperlipídica. Além disso, foi encontrado que a pressão arterial média, sistólica e diastólica teve um leve aumento, porém significativo, quando comparado ao grupo controle, bem como a frequência cardíaca que, no caso dos animais que fizeram ingestão da dieta hiperlipídica, estava significativamente elevada. Rodrigues (2009) verificou que ratos que ingeriram dieta hiperlipídica por quatro semanas, tiveram elevação significativa da pressão arterial sistólica, porém, sem alteração da pressão arterial média e diastólica. Assim como aconteceu em nossos resultados, este autor não observou diferenças significativas na frequência cardíaca. A variabilidade da frequência cardíaca (VFC), que pode ser determinada analisando o comportamento da FC e a duração do intervalo RR, se tornou um importante parâmetro para determinação de risco cardiovascular (BILLMAN, 2011). A FC não possui comportamento estático, mas continuamente está sendo alterada tanto por conta de respostas físicas e demandas mentais, entretanto, tanto a redução na VFC, quanto o aumento podem estar relacionadas com distúrbios cardiovasculares (DeJONG & RANDALL, 2005; THAYLER; YAMAMOTO; BROSSCHOT, 2010). O controle da FC é resultado de diversos mecanismos fisiológicos que constantemente estão promovendo alterações no ritmo cardíaco. Dentre os mecanismos que realizam este controle, temos a participação do sistema nervoso autônomo, cujo funcionamento pode ser analisado pela duração dos intervalos RR. De forma geral, quando observamos um aumento na duração destes intervalos, teríamos maior atividade do sistema nervoso parassimpático, que promove diminuição das funções cardíacas

(BILCHICK & BERGER, 2006). Além de complicações metabólicas já discutidas, a ingestão de dieta hiperlipídica pode promover alterações de outros parâmetros fisiológicos, como por exemplo, a ativação do eixo sistema nervoso simpático-medula da adrenal (MIOTTO, 2006). Esta ativação resultaria em elevação das concentrações de catecolaminas e, conseqüentemente, na variabilidade da frequência cardíaca. Apesar de não identificarmos alterações significativas na duração dos intervalos RR, a elevação da pressão arterial sistólica, verificada por Rodrigues (2009) para animais que fizeram ingestão da dieta hiperlipídica por quatro semanas, pode ser um indício de que a atividade do sistema nervoso simpático possa estar sendo elevada. Miotto (2006) mostrou que, além da elevação da pressão arterial simpática, os ratos que ingeriram a dieta hiperlipídica por seis semanas, também tiveram elevações significativas da pressão arterial média e diastólica, bem como da frequência cardíaca, o que demonstraria um aumento mais expressivo da atividade do sistema nervoso simpático, com duas semanas a mais de tratamento com a dieta.

A atividade do sistema nervoso simpático não é exclusiva no tecido cardíaco e influencia outros processos metabólicos no organismo. A noradrenalina liberada pelos neurônios pós-ganglionares simpáticos é um importante regulador da lipólise (VARGOVIC et al., 2011). Se considerarmos a hipótese de que a dieta hiperlipídica é capaz de elevar a atividade simpática, novamente poderíamos pensar em divergências com resultados discutidos anteriormente para a captação de glicose e liberação de lactato, pelos adipócitos isolados do tecido adiposo, que mostraram menor sensibilidade para noradrenalina. Provavelmente, a diferença de comportamento entre os tecidos deve-se a uma menor sensibilidade localizada no tecido adiposo, sendo que na musculatura cardíaca este efeito não está evidenciado, da mesma forma que acontece para insulina.

Considerações finais

Em suma, considerando que modelos de estresse alteram as funções metabólicas e cardiovasculares nos indivíduos e que estes distúrbios tem sido o grande foco de estudo na ciência atual. Podemos tecer as seguintes considerações frente aos modelos de estresse estudados em nosso laboratório.

O estresse induzido pelo modelo de natação estudado no Labeest é benéfico, pois melhora a captação de glicose no rato.

Em relação aos modelos de estresse por choques nas patas e dislipidemia induzida pela dieta ao longo de quatro e seis semanas nossos resultados mostraram que em todos os modelos ocorre o desenvolvimento do quadro de dislipidemia, bem como redução na sensibilidade à insulina e alterações cardíacas. Entretanto, análise comparativa destes modelos indica que utilização da dieta hiperlipídica, mesmo sendo por quatro semanas de tratamento, é o método mais prático, pois não há sem necessidade de equipamentos específicos, para indução e estudo de alterações metabólicas e cardíacas. Outro ponto importante refere-se ao tempo de tratamento dos ratos com dieta hiperlipídica. A maioria dos trabalhos na literatura propõe tempos prolongados de ingestão da dieta hiperlipídica pelos animais. Em outras pesquisas realizadas no LABEEST, os ratos que ingeriram a dieta hiperlipídica por seis semanas apresentaram alterações metabólicas e cardíacas que também foram verificadas nos ratos que ingeriram a dieta hiperlipídica durante somente quatro semanas. A administração da dieta a ratos jovens por um período de quatro semanas pode ser um modelo para se estudar alterações metabólicas e cardíacas descritas nesta tese. Além disso, este modelo pode ser utilizado para estudos do desenvolvimento de dislipidemia bem como a sua prevenção.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que ratos que ingerem dieta hiperlipídica por quatro semanas já apresentam alterações metabólicas e cardíacas, sendo, portanto, um modelo útil para o estudo das doenças decorrentes da dislipidemia e o desenvolvimento da mesma.

Alterações metabólicas:

Em ratos anestesiados foi possível identificar a alteração de sensibilidade à insulina pelas técnicas de *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, que apresentou taxa de infusão de glicose significativamente diminuída, bem como pela diminuição na captação de 2-DG pelos adipócitos isolados da região epididimal. Inferimos que a diminuição na produção de lactato em adipócitos isolados seja decorrente da menor captação de glicose neste tecido. A lipólise basal não foi alterada, entretanto, a estimulada por agonistas adrenérgicos apresentou-se diminuída e estas alterações não comprometeram a morfometria dos adipócitos epididimais.

Alterações cardíacas:

Os ratos submetidos à dieta hiperlipídica por quatro semanas já apresentaram alterações cardíacas indicando a instalação do quadro de hipertrofia cardíaca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE H, MINOKOSHI Y, SHUMAZU T. Effect of a β_3 -adrenergic agonist, BRL35135A, on glucose uptake in rat skeletal muscle in vivo and in vitro. **J. Endocrinol.** 1993; 139: 479-486.

ABEL ED. Myocardial insulin resistance and cardiac complications of diabetes. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.** 2005; 5: 219–26.

AGOSTO E, CIMMINO M, MINAIRE Y, GELOEN A. Short-term cold-exposure does not improve insulin sensitivity in rats. **Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.** 1997; 117 (2): 231-238.

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

AHMED ML, ONG KK, DUNGER DB. Childhood obesity and the timing of puberty. **Trends Endocrinol Metab.** 2009; 20: 237–242.

ALMEIDA J. Captação periférica de glicose em modelo de estresse induzido por choque nas patas. **Tese de Doutorado.** Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, 2008.

ANSARULLAH, JAYARAMAN S, HARDIKAR AA, RAMACHANDRAN AV. Influence of *Oreocnide integrifolia* (Gaud.) Miq on IRS-1, Akt and Glut-4 in Fat-Fed C57BL/6J Type 2 Diabetes Mouse Model. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2011; 2011:852720.

ARAI Y, TAKAYAMA M, ABE Y, HIROSE N. Adipokines and aging. **J Atheroscler Thromb.** 2011; 18(7): 545-50.

ARNSTEN AF. Through the looking glass: differential noradrenergic modulation of prefrontal cortical function. **Neural Plast.** 2000; 7(1-2):133-46.

ARNSTEN AF. Catecholamine influences on dorsolateral prefrontal cortical networks. **Biol Psychiatry.** 2011; 15; 69(12): e89-99.

BAILEY EF. A tasty morsel: the role of the dorsal vagal complex in the regulation of food intake and swallowing. Focus on BDNF/TrkB signaling interacts with GABAergic system to inhibit rhythmic swallowing in the rat. **American Journal of Physiology**. 2008; 295 (4): 1048–1049.

BARASCUK N, VASSILIADIS E, ZHENG Q, WANG Y, WANG W, LARSEN L, RASMUSSEN LM, KARSDAL MA. Levels of Circulating MMCN-151, a Degradation Product of Mimecan, Reflect Pathological Extracellular Matrix Remodeling in Apolipoprotein E Knockout Mice. **Biomark Insights**. 2011; 6: 97-106.

BARET G, PEYRONNET J, GRASSI-KASSISSE DM, DALMAZ Y, WIERNSPERGER N, GELOEN A. Increased intraabdominal adipose tissue mass in fructose fed rats: correction by metformin. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**. 2002; 110 (6): 298-303.

BARR CS, NAAS A, FREEMAN M, LANG CC, STRUTHERS AD. QT dispersion and sudden unexpected death in chronic heart failure. **Lancet**. 1994; 5; 343(8893):327-9.

BEGUM N, LEITNER W, REUSCH JE, SUSSMAN KE, DRAZNIN B. GLUT-4 phosphorylation and its intrinsic activity. Mechanism of Ca²⁺-induced inhibition of insulin-stimulated glucose transport. **J. Biol. Chem**. 1993; 268: 3352-3356.

BERGMAN RN, ADER M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **TEM**. 2000; 11(9): 351-356.

BILCHICK KC, BERGER RD. Heart rate variability. **J Cardiovasc Electrophysiol**. 2006; 17: 691-4.

BILLMAN GE. Heart rate variability - a historical perspective. **Front Physiol**. 2011; 2: 86.

BLAIR SN. Physical inactivity: the biggest public health problem of the 21 st century. **Br J Sports Med**. 2009; 43: 1 -2.

BOSCHMANN M., KRUPP G, LUFT FC, KLAUS S, JORDAN J. In vivo response to alpha(1)-adrenoceptor stimulation of glucose uptake in human white adipocytes. **Obes. Res.** 2002; v. 10, p.555-558.

BRANDT N, DE BOCK K, RICHTER EA, HESPEL P. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2010; 299 (2): E215-24.

BRAY GA, PAERATAKUL S, POPKIN BM. Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. **Physiol Behav.** 2004; 83: 549-55.

BROOKS GA. Lactate shuttles in nature. **Biochem Soc Trans.** 2002; 30:258–264.

BROWN MA, STORLIEN LH, HUANG XF, TAPSELL LC, ELSE PL, HIGGINS JA, BROWN IL. Dietary Fat and Carbohydrate Composition: Metabolic Disease. In: **Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects.** 2010; 21.

BRYANT NJ, GOVERS R, JAMES DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT 4. **Molecular Cell Biology.** 2002; 3: 267-277.

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

CARLSON NR. O comportamento alimentar. In: **Fisiologia do Comportamento.** 2002; 7ª edição: 392-422.

CHAMPE, PC, HARVEY RA. Metabolismo no estado absorptivo. In: **Bioquímica ilustrada.** 2002; 2 ed, Porto Alegre: Artmed, p.292.

CHANG L, CHIANG SH, SALTIEL AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. **Mol Med.** 2004; 10 (7-12): 65-71.

CHENG JT, LIU IM, YEN ST, CHEN PC. Role of α 1-adrenoceptor in the regulation of glucose uptake into white adipocyte of rats in vitro. **Autonomic Neuroscience: basic and clinical**. 2000; 84:140 - 146.

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.

COLLINS S, DANIEL KW, PETRO AE, SURWIT RS. Strain-specific response to β 3-adrenergic receptor agonist treatment of diet-induced obesity in mice. **Endocrinology**. 1997; 138: 405-413.

CONSITT LA, BELL JA, HOUMARD JA. Intramuscular lipid metabolism, insulin action, and obesity. **IUBMB Life**. 2009; 61 (1): 47-55.

COSTA ECS, GONCALVES AA, AREAS MA, MORGABEL RGB. Os efeitos da metformina sobre a dispersão do intervalo QT e QTc de ratos diabéticos. **Arq Bras Cardiol**. 2008; 90(4): 232-238.

CRANDALL 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.

CREGE DRXO. Implantação da técnica de estudo funcional de adipócitos isolados de tecido adiposo visceral de humanos eutróficos e quantificação da produção de lactato. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, 2007.

CUSHMAN SV, WARDZALA LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. **J. Biol. Chem**. 1980; v. 255: 4758-4762.

DANEV S, NIKOLOVA R, KEREKOVSKA M, SVETOSLAVOV S. Relationship between heart rate variability and hypercholesterolaemia. **Cent. Eur. Publ. Hlth**. 1997; 5 (3): 143-146.

DeBOSCH B, TRESKOV I, LUPU TS, WEINHEIMER C, KOVACS A, COURTOIS M, MUSLIN AJ. Akt1 is required for physiological cardiac growth. **Circulation**. 2006; May 2; 113(17): 2097-104.

DeFILIPPIS E, ALVAREZ G, BERRIA R, CUSI K, EVERMAN S, MEYER C, MANDARINO LJ. Insulin-resistant muscle is exercise resistant: evidence for reduced response of nuclear-encoded mitochondrial genes to exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2008; 294: E607–E614.

DeFRONZO RA. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. **Int J Clin Pract Suppl**. 2004; (143): 9-21.

DeFRONZO RA, FERRANNINI E. Insulin resistance – A multifactorial syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**. 1991; 14 (3): 173-194.

DeJONG MJ, RANDALL DC. Heart rate variability analysis in the assessment of autonomic function in heart failure. **J Cardiovasc Nurs**. 2005; 20(3) :186-95.

DeSOUZA CJ, HIRSHMAN MF, HORTON ES. CL-316,243, a beta3-specific adrenoceptor agonist, enhances insulin-stimulated glucose disposal in nonobese rats. **Diabetes**. 1997; 46: 1257-63.

DHINGRA R, NAM BH, BENJAMIN EJ, WANG TJ, LARSON MG, D'AGOSTINO RB, LEVY D, VASAN RS. Cross-sectional relations of electrocardiographic QRS duration to left ventricular dimensions. **Journal of the American College of Cardiology**. 2005; 45: 685-689.

DiGIROLAMO M, NEWBY FD, HILL J. Blood lactate levels in human obesity. **Int. J. Obesity**. 1989; 13, p. 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.

DIÉGUEZ C, VAZQUEZ MJ, ROMERO A, LÓPEZ M, NOGUEIRAS R. Hypothalamic control of lipid metabolism: Focus on leptin, ghrelin and melanocortins. **Neuroendocrinology**. 2011; 94: 1-11.

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

DUCLUZEAU PH, FLETCHER LM, VIDAL H, LAVILLE M, TAVARÉ JM. Molecular mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. **Diabetes Metab (Paris)**. 2002; 28: 85-92.

ESPOSITO K, CERIELLO A, GIUGLIANO D. Diet and the metabolic syndrome. **Metab Syndr Relat Disord**. 2007; 5: 291-6.

ESTRELA HFG. Reatividade vascular de anéis de aorta isolada de ratos normo ou hiperlipidêmicos, sedentários ou submetidos à natação. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, 2007.

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

FAINTRENIE G, GÉLOËN A. Alpha-1 adrenergic stimulation uptake in white adipocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1998; 286: 607-610.

FANG CX, DONG F, THOMAS DP, MA H, HE L, REN J. Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2008; 295(3): H1206-H1215.

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

FARIAS-SILVA E, GRASSI-KASSISSE DM, WOLF-NUNES V, SPADARI-BRATFISCH RC. Stress-induced alteration in the lipolytic response to β -adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. **J Lip Res**. 1999; 40: 1719-27.

FARIAS-SILVA E, SAMPAIO-BARROS MM, AMARAL ME, CARNEIRO EM, BOSCHERO AC, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Subsensitivity to insulin in adipocytes from rats submitted to foot-shock stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 2002; 80 (8), 783-789.

FARIAS-SILVA E, DOS SANTOS IN, COREZOLA DO AMARAL ME, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Glucocorticoid receptor and beta-adrenoceptor expression in epididymal adipose tissue from stressed rats. **Ann N Y Acad Sci.** 2004; 1018: 328-332, 2004.

FERRIS WF, CROWTHER NJ. Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue. **Cardiovasc J Afr.** 2011; 22(3): 147-54. Review.

FILLMORE N, JACOBS DL, MILLS DB, WINDER WW, HANCOCK CR. Chronic AMP-activated protein kinase activation and a high-fat diet have an additive effect on mitochondria in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol.** 2010; 109 (2): 511-20.

FLUGGE G. Effects of cortisol on brain alpha2- adrenoceptors: potential role in stress. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 1999; 23(7): 949-956.

FOLLI F, SAAD MJ, BACKER JM, KAHN CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. **J Biol Chem.** 1992; 267(31): 22171-7.

FRANSEN R, MONAJEMI H, STROES ES, KASTELEIN JJ. Obesity and dyslipidemia. **Med Clin North Am.** 2011; Sep; 95(5): 893-902.

FREDERICH RC, HAMANN A, ANDERSON S, LOLLMANN B, LOWELL BB, FLIER JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat Med.** 1995; 1(12):1311-1314.

GAIDHU MP, ANTHONY NM, PATEL P, HAWKE TJ, CEDDIA RB. Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2010; 298(4): C961-71.

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.

GAUTRON L, ELMQUIST JK. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. **J Clin Invest.** 2011 Jun 1; 121(6): 2087-93.

GELLAI M, RUFFOLO RR. Renal effects of selective alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor agonists in conscious, normotensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1987; 250: 723.

GILDE AJ, VAN DER LEE KA, WILLEMSSEN PH, CHINETTI G, VAN DER LEIJ FR, VAN DER VUSSE GJ. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\{\alpha\}$ and PPAR $\{\beta\}/\{\delta\}$, but not PPAR $\{\gamma\}$, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. **Circ Res.** 2003; 92: 518–24.

GILMAN AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Ann. Ver. 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.

GINSBERG HN. Lipoprotein physiology and its relationship to atherogenesis. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 1990; 19(2): 211-28.

GLAZER HP, OSIPOV RM, CLEMENTS RT, SELLKE FW, BIANCHI C. Hypercholesterolemia is associated with hyperactive cardiac mTORC1 and mTORC2 signaling. **Cell Cycle.** 2009; Jun 1; 8 (11): 1738-46.

GOLLISCH KS, BRANDAUER J, JESSEN N, TOYODA T, NAYER A, HIRSHMAN MF, GOODYEAR LJ. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in

normal- and high-fat diet-fed rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2009; Aug; 297(2): E495-504.

GREENBERG D, SMITH GP, GIBBS J. Intraduodenal infusions of fats elicit satiety in sham-feeding rats. **Am. J.Physiol.** 1990; 259: 110-118.

GRUNDY SM, BEARN AG. The role of cholesterol in atherosclerosis: new therapeutic opportunities. **Hanley & Belfus, Philadelphia.** 1988; 261.

HAGSTRÖM-TOFT E, ENOKSSON S, MOBERG E, BOLINDER J, ARNER P. Absolute concentrations of glycerol and lactate in human skeletal muscle, adipose tissue, and blood. **Am J Physiol.** 1997; 273(3 Pt 1):E584–E592.

HAJDUCH E, HEYES RR, WATT PW & HUNDAL HS. Lactate transport in rat adipocyte: identification of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and its modulation during streptozotocin-induced diabetes. **FEBS Letters.** 2000; 479: 89 - 92.

HALUZIK M, FIEDLER J, NEDVÍDKOVÁ J, CESKA R. Serum leptin levels in patients with hyperlipidemias. **Nutrition.** 2000; 16: 429-433.

HAN DH, HANSEN PA, HOST HH, HOLLOSZY JO. Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. **Diabetes.** 1997; 46(11): 1761-7.

HAN JC, LAWLOR DA, KIMM SY. Childhood obesity. **Lancet.** 2010; 375:1737–1748.

HARDIE DG. Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status. **Endocrinology.** 2003; 144 (12): 5179-5183.

HASLAM DW, JAMES WP. Obesity. **Lancet.** 2005; 366(9492) :1197-209.

HATORE ET. Efeito da intensidade do estresse sobre marcadores metabólicos. **Dissertação de Mestrado.** Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, 2006.

HAWLEY JA, LESSARD SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action. **Acta Physiol (Oxf)**. 2008; 192: 127–135.

HENKENS IR, MOUCHAERS KT, Vlieggen HW, VAN DER LAARSE WJ, SWENNE CA, MAAN AC. Early changes in rat hearts with developing pulmonary arterial hypertension can be detected with three-dimensional electrocardiography. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2007; 293: H 1300-1307.

HENKENS IR, SCHERPTONG RWC, VAN KRALINGEN KW, SAID SAM, Vlieggen HW. Pulmonary hypertension: the role of the Electrocardiogram. **Neth Heart J**. 2008; 16: 250-254.

HENRIKSEN EJ, BOUREY RE, RODNICK KJ, KORANYI L, PERMUTT MA, HOLLOSZY JO. Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. **Am. J. Physiol**. 1990; 259: E593-E598.

HENSLER M, BARDOVA K, JILKOVA ZM, WAHLI W, MEZTGER D, CHAMBON P, KOPECKY J, FLACHS P. The inhibition of fat cell proliferation by n-3 fatty acids in dietary obese mice. **Lipids Health Dis**. 2011; Aug 2; 10:128.

HIGASHIDA K, HIGUCHI M, TERADA S. Dissociation between PGC-1alpha and GLUT-4 expression in skeletal muscle of rats fed a high-fat diet. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**. 2009; 55(6): 486-91.

HJELKREM MC, TORRES DM, HARRISON SA. Nonalcoholic fatty liver disease. **Minerva Med**. 2008; Dec; 99(6):583-93.

HOLLAND WL, KNOTTS TA, CHAVEZ JA, WANG LP, HOEHN KL, SUMMERS SA. Lipid mediators of insulin resistance. **Nutrition Reviews**. 2007; 65(6): S39-S46.

HOLM C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. **Biochem Soc Trans**. 2003; 31(Pt 6): 1120-4.

HONORS MA, HARGRAVE SL, KINZIG KP. Glucose Tolerance in Response to a High-Fat Diet Is Improved by a High-Protein Diet. **Obesity (Silver Spring)**. 2011; 10: 1038.

HOWARD BV. Insulin resistance and lipid metabolism. **Am. J. Cardiol.** 1999; 84: 28J-32J.

HUANG S, CZECH M. The GLUT 4 glucose transporter. **Cell Metabolism**. 2007; 5: 237-252.

HUANG Y, WALKER KE, HANLEY F, NARULA J, HOUSER SR, TULENKO TN. Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet. **Circulation**. 2004; 109: 97-102.

IVY JL. Role of exercise training in the prevention and treatment of insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Sports Med.** 1997; 24(5): 321-36.

IVY JL. Muscle insulin resistance amended with exercise training: role of GLUT4 expression. **Med Sci Sports Exerc.** 2004; Jul; 36(7): 1207-11.

JACINTO E. What controls TOR? **IUBMB Life**. 2008; 60: 483-96.

JANSSON PA, SMITH U, LÖNNROTH P. Evidence for lactate production by human adipose tissue in vivo. **Diabetologia**. 1990; 33:253–256.

JECKEL KM, MILLER KE, CHICCO AJ, CHAPMAN PL, MULLIGAN CM, FALCONE PH, MILLER ML, PAGLIASSOTTI MJ, FRYE MA. The role of dietary fatty acids in predicting myocardial structure in fat-fed rats. **Lipids Health Dis.** 2011; Jun 7; 10:92.

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.

KADOWAKI T, HARA K, YAMAUCHI T, TERAUCHI Y, TOBE K, NAGAI R. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. **Exp Biol Med (Maywood)**. 2003; 228(10): 1111-7.

KAHLER A, GEARY N, ECKEL LA, CAMPFIELD LA, SMITH FJ, LANGHANS W. Chronic administration of OB protein decreases food intake by selectively reducing meal size in male rats. **Am J Physiol**. 1998; 275(1 pt 2): R180–R185.

KASAHARA M, HINKLE PC. Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. **J Biol Chem**. 1977; 252: 7384–7390.

KASHIWAGI A, FOLEY JE. Opposite effects of a beta-adrenergic agonist and a phosphodiesterase inhibitor on glucose transport in isolated human adipocytes: isoproterenol increases V_{max} and IBMX increases K_s. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 1982; 107: 1151-1157.

KAUFMAN LN, PETERSON MM, SMITH SM. Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. **Am. J. Physiol**. 1991; E95-E100.

KAWADA T, OKADA K. The metabolic syndrome: prevalence and associated lifestyles in Japanese workingmen. **J Cardiometab Syndr**. 2006; 1(5): 313-317.

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.

KEMP BE, MITCHELHILL KI, STAPLETON D, MICHELL BJ, CHEN ZP, WITTERS LA. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. **Trends Biochem Sci**. 1999; 24: 22–25.

KERSHAW EE, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**. 2004; Jun; 89(6): 2548-56.

KIZILBASH MA, CARNETHON MR, CHAN C, JACOBS DR, SIDNEY S, LIU K. The temporal relationship between heart rate recovery immediately after exercise and the metabolic syndrome: the CARDIA study. **Eur Heart J.** 2006; 27(13): 1592-6.

KLAUS S. Increasing the Protein: Carbohydrate Ratio in a high-fat diet delays the development of adiposity and improves glucose homeostasis in Mice. **J Nutr.** 2005; 135:1854-8.

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.

KOISTINEN HA, GALUSKA D, CHIBALIN AV, YANG J, ZIERATH JR, HOLMAN GD, WALLBERG-HENRIKSSON H. 5-amino-imidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes. **Diabetes.** 2003; 52: 1066–1072.

KONES R. Recent advances in the management of chronic stable angina I: approach to the patient, diagnosis, pathophysiology, risk stratification, and gender disparities. **Vasc Health Risk Manag.** 2010; 9; 6: 635-56.

KOPLAN JP, LIVERMAN CT, KRAAK VI. Preventing childhood obesity: health in the balance: executive summary. **J Am Diet Assoc.** 2005; 105: 131–138.

KOUTSARI C, ALI AH, MUNDI MS, JENSEN MD. Storage of circulating free fatty acid in adipose tissue of postabsorptive humans: quantitative measures and implications for body fat distribution. **Diabetes.** 2011; 60(8): 2032-40.

KRAMER HF, WITCZAK CA, TAYLOR EB, FUJII N, HIRSHMAN MF, GOODYEAR LJ. AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle. **J Biol Chem.** 2006; 281(42): 31478-85.

KREIER F, KAP YS, METTENLEITER TC, VAN HEIJNINGEN C, VAN DER VLIET J, KALSBECK A, SAUERWEIN HP, FLIERS E, ROMIJN JA, BUIJS RM. Tracing from fat tissue, liver, and pancreas: a neuroanatomical framework for the role of the brain in type 2 diabetes. **Endocrinology**. 2006; 147: 1140–1147.

KUSUNOKI M, TSUTSUMI K, HARA T, OGAWA H, NAKAMURA T, MIYATA T, SAKAKIBARA F, FUKUZAWA Y, SUGA T, KAKUMU S, NAKAYA Y. Correlation Between Lipid and Glycogen Contents in Liver and Insulin Resistance in High-Fat-Fed Rats Treated With the Lipoprotein Lipase Activator NO-1886. **Metabolism**. 51 (6): 792-795, 2002.

LAFONTAN M, BERLAN M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. **J. Lipid Res**. 1993; 34: 1057–1091.

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

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

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

LANDSBERG L, YOUNG JB. Catecholamines and adrenal medulla. In: WILSON JD, FOSTER DW. **Williams Textbook of Endocrinology**. 1992; Philadelphia Saunders, 8ed: 621-706.

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

LANGIN D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. **Pharmacol. Res.** 2006; 53: 482–491.

LANGOUCHE L, PERRE SV, THIESSEN S, GUNST J, HERMANS G, D'HOORE A, KOLA B, KORBONITS M, Van den BERGHE G. Alterations in adipose tissue during critical illness: An adaptive and protective response? **Am Respir Crit Care Med.** 2010 15; 182(4): 507-16.

LASS A, ZIMMERMANN R, OBERER M, ZECHNER R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. **Prog Lipid Res.** 2011; 50(1): 14-27.

LAURENCIKIENE J, SKURK T, KULYTÉ A, HEDÉN P, ASTRÖM G, SJÖLIN E, RYDÉN M, HAUNER H, ARNER P. Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject. **J Clin Endocrinol Metab.** 2011; 96(12): E2045-9.

LAVIOLA L, PERRINI S, CIGNARELLI A, GIORGINO F. Insulin signaling in human adipose tissue. **Archives of Physiology and Biochemistry.** 2006; 112(2): 82-88.

LAWRENCE JC, PIPER RC, ROBINSON LJ, JAMES DE. GLUT4 facilitates insulin stimulation and camp-mediated inhibition of glucose transport. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1992; 89: 3493-3497.

LeFEVRE PG. Evidence of active transfer of certain non-electrolytes across the human red cell membrane. **J Gen Physiol.** 1948; 31: 505–527.

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

LICINIO J. Effects of leptin replacement on macro- and micronutrient preferences. **Int J Obes (Lond).** 2007; 31(12):1859–1863.

LIN LY, KUO HK, LAI LP, LIN JL, TSENG CD, HWANG JJ. Inverse correlation between heart rate recovery and metabolic risks in healthy children and adolescents: insight from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. **Diabetes Care.** 2008; 31(5): 1015-20.

LIU YL, STOCK M.J. Acute effects of the β_3 -adrenoceptor agonist, BRL35135, on tissue glucose utilization. **Br. J. Pharmacol.** 1995; 114: 888-894.

LIU X, PERUSSE F, BUKOWIECKI LJ. Mechanisms of the antidiabetic effects of the beta 3-adrenergic agonist CL-316243 in obese Zucker-ZDF rats. **Am J Physiol.** 1998; 274 (5 Pt 2): R1212-R1219.

LLADÓ I, RODRÍGUEZ-CUENCA S, PUJOL E, MONJO M, ESTRANY ME, ROCA P, PALOU A. Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats. **Obes Res.** 2002; 10(4): 296-305.

LOPES NHM, GRUPI C, DINA CH, DE GÓIS AFT, HAJJAR LA, AYUB B, ROCHITTE CE, RAMIRES JAF, HUEB AW, KALIL R. QT Interval Dispersion Analysis in Acute Myocardial Infarction Patients: Coronary Reperfusion Effect. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** 2006; 87 (2).

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.

MALMINIEMI K, LAHTELA JT, HUUPPONEN R. Effects of celiprolol on insulin sensitivity and glucose tolerance in dyslipidemic hypertension. **International Journal of Clinical Pharmacol. and Therapeutics.** 1995; 32 (3): 156-163.

MARIN P, HOGH-KRISTIANSEN I, JANSSON S, KROTKIEWSKI M, HOLM G, BJORNTORP P. Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides in vivo in humans. **Am J Physiol.** 1992; 263: E473-E480.

MARINETTI GV. Disorders of lipid metabolism. **Plenum Press, New York.** 1990; 226.

MARTINELLI TCP. Efeito da natação na sensibilidade periférica a insulina em ratos. **Dissertação Mestrado.** Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, 2009.

MARTY N, DALLAPORTA M, THORENS B. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. **Physiology (Bethesda)**. 2007; 22: 241-51.

McCARTY, M.F. Elevated sympathetic activity may promote insulin resistance syndrome by activating alpha-1 adrenergic receptors on adipocytes. **Medical hypotheses**. 2004; 62: 830-838.

McGEE SL, HARGREAVES M. Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanisms. **Clinical and experimental Pharmacology and Physiology**. 2006; 33: 395-399.

MERAL I, KACMAZ R. Effects of diet treatment on some biochemical and physiological parameters in patients with type 2 diabetes mellitus. **Tohoku J Exp Med**. 2003; May; 200(1): 25-30.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Uma análise da situação de saúde. **Perfil de Mortalidade do Brasileiro**. 2008.

MIOTTO AM. Perfil lipídico e sensibilidade adrenérgica em átrio direito de ratos normo e hipercolesterolêmicos tratados ou não com infuso das cascas de Croton cajucara Benth. **Dissertação Mestrado**. Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, 2001.

MIOTTO AM. Alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas pela dieta hiperlipídica em ratos. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, 2006.

MITROU PN, KIPNIS V, THIEBAUT AC, REEDY J, SUBAR AF, WIRFALT E. Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. **Arch Intern Med**. 2007; 167: 2461-8.

MOREIRA MF. Sensibilidade adrenérgica de átrios direitos isolados de ratos normo ou hiperlipidêmicos sedentários ou submetidos à natação. **Dissertação Mestrado**. Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MORENO-ALIAGA MJ, LAMAS O, MARTI A, MARTÍNEZ JA. Effects of a beta3-adrenergic agonist on glucose uptake and leptin expression and secretion in cultured adipocytes from lean and overweight (cafeteria) rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2002; 291(5): 1201-1207.

MUECKLER M, CARUSO C, BALDWIN SA, PANICO M, BLENCH I, MORRIS HR, ALLARD WJ, LIENHARD GE, LODISH HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. **Science.** 1985; 229: 941–945.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **Eur. J. Biochem.** 1994; 219: 713-725.

MUECKLER M, MAKEPEACE C. Model of the exofacial substrate-binding site and helical folding of the human Glut1 glucose transporter based on scanning mutagenesis. **Biochemistry.** 2009; 48: 5934–5942.

MUROS MOLINA JJ, OLIVERAS LÓPEZ MJ, MAYOR REYES M, REYES BURGOS T, LÓPEZ GARCÍA DE LA SERRANA H. Influence of physical activity and dietary habits on lipid profile, blood pressure and BMI in subjects with metabolic syndrome. **Nutr Hosp.** 2011; 26(5): 1105-9.

MUSI N, HAYASHI T, FUJII N, HIRSHMAN MF, WITTERS LA, GOODYEAR LJ. AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2001; 280: E677–E684.

MYSLIVECEK J, RÍCNÝ J, KOLÁR F, TUCEK S. The effects of hydrocortisone on rat heart muscarinic and adrenergic α_1 , β_1 and β_2 receptors, propranolol-resistant binding sites and on some subsequent steps in intracellular signaling. **Naunyn Schimiedeberg's. Arch. Pharmacol.** 2003; 368: 366-376.

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.

NEVZOROVA J, EVANS BA, BENGTSSON T, SUMMERS RJ. Multiple signaling pathways involved in β_2 -adrenoceptor-mediated glucose uptake in rat skeletal muscle cells.

Br J Pharmacol. 2006; 147: 446-454.

NIKAMI H, SHIMIZU Y, SUMIDA M, MINOKOSHI Y, YOSHIDA T, SAITO M, SHIMAZU T. Expression of β_3 -adrenoceptor and stimulation of glucose transport by β_3 -agonists in brown adipocytes primary culture. **J. Biochem.** 1996; 119: 120-125.

NOEMAN SA, HAMOODA HE, BAALASH AA. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. **Diabetol Metab Syndr.** 2011; 3(1):17.

NOGUEIRAS R, LOPEZ M, DIEGUEZ C. Regulation of lipid metabolism by energy availability: A role for the central nervous system. **Obes Rev.** 2010; 11: 185–201.

NONOGAKI K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. **Diabetologia.** 2000; 43: 533-549.

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.

OLFERT BM, CROSS AA, WILLIAM MC. Guide to the Care and Use of experimental animals. **Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Ontario.** 1993; 213.

PAIGEN B, HOLMES PA, MITCHELL D, ALBEE D. Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. **Atherosclerosis.** 1987; Apr; 64(2-3): 215-21.

PAN KL, HSU JT, CHANG ST, CHUNG CM, CHEN MC. Prognostic value of QT dispersion change following primary percutaneous coronary intervention in acute ST elevation myocardial infarction. **Int Heart J.** 2011; 52(4): 207-11.

PANVELOSKI-COSTA AC, PINTO JÚNIOR DA, BRANDÃO BB, MOREIRA RJ, MACHADO UF, SERAPHIM PM. Resistive training reduces inflammation in skeletal muscle and improves the peripheral insulin sensitivity in obese rats induced by hyperlipidic diet. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** 2011; 55(2):155-63.

PAPOTI M, ALMEIDA FBL, PRADA FJA, ELENO TG, HERMINI HÁ, GOBATTO CA, MELLO MAR. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica. **Motriz, Rio Claro.** 2003; v.9, n.2, p.103-110.

PATERNOSTRO G, CAMICI PG, LAMMERSTMA AA, MARINHO N, BALIGA RR, KOONER JS. Cardiac and skeletal muscle insulin resistance in patients with coronary heart disease. A study with positron emission tomography. **J Clin Invest.** 1996; 98: 2094–9.

PATTERSON C, PORTBURY AL, SCHISLER JC, WILLIS MS. Tear me down: role of calpain in the development of cardiac ventricular hypertrophy. **Circ Res.** 2011; 5; 109(4):453-62.

PICCHI MG, DE MATTOS AM, BARBOSA MR, DUARTE CP, GANDINI MDE A, PORTARI GV, JORDÃO AA. A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. **Acta Cir Bras.** 2011; 26 Suppl 2: 25-30.

PIMENTEL EB. Estabilidade temporal do registro de eletrocardiograma em ratos com infarto do miocárdio. **Dissertação de Mestrado.** Centro Biomédico - Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.

PINHEIRO DC, GRASSI-KASSISSE, DM. Análise morfológica de adipócitos isolados de regiões mesentérica, epididimal e peri-renal de ratos submetidos a estresse. **XXV Congresso Interno de Iniciação Científica – Unicamp.** 2007.

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

PRADA PO, PAULI JR, ROPELLE ER, ZECCHIN HG, CARVALHEIRA JB, VELLOSO LA, SAAD MJ. Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats. **FEBS Letters**. 2006; 580: 4889-4894.

PRIOR LJ, EIKELIS N, ARMITAGE JA, DAVERN PJ, BURKE SL, MONTANI JP, BARZEL B, HEAD GA. Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. **Hypertension**. 2010; Apr; 55(4): 862-8.

PROIETTO J, FILIPPIS A, NAKHLA C, CLARK S. Nutrient-induced insulin resistance. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 1999; 151: 143–149.

PSHENICHNIKOV I, SHIPILOVA T, LAANE P, MEIGAS K, ANIER A, KAIK J. Prognostic value of QT interval dispersion during exercise in patients with stable angina. **Seminars in Cardiovascular Medicine**. 2008; 14: 3.

QUEIROZ JC, ALONSO-VALE MI, CURI R, LIMA FB. Control of adipogenesis by fatty acids. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. 2009; 53(5): 582-94.

QVISTH V, HAGSTRÖM-TOFT E, MOBERG E, SJOBERG S, BOLINDER J. Lactate release from adipose tissue and skeletal muscle in vivo: defective insulin regulation in insulin-resistant obese women. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2007; 292:E709–E714.

RAI S, HARE DL, ZULLI A. A physiologically relevant atherogenic diet causes severe endothelial dysfunction within 4 weeks in rabbit. **Int J Exp Pathol**. 2009; Dec; 90(6): 598-604.

RAIKKONEN K, MATTHEWS KA, KULLER LH. Depressive symptoms and stressful life events predict metabolic syndrome among middle-aged women: a comparison of World Health Organization, Adult Treatment Panel III and International Diabetes Foundation definitions. **Diabetes Care**. 2007; 30(4): 872-77.

RAMOS LAF. Efeito da melatonina sobre parâmetros cardiovasculares em ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, 2010.

RANDLE PJ, GARLAND PB, HALES CN, NEWSHOLME EA. The glucose-fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances in diabetes mellitus. **Lancet**. 1963; 1: 785-789.

RAŻNY U, WAȚOR Ł, POLUS A, KIEĆ-WILK B, WAN YJ, DYDUCH G, TOMASZEWSKA R, DEMBIŃSKA-KIEĆ A. Modulatory effect of high saturated fat diet-induced metabolic disturbances on angiogenic response in hepatocyte RXR α knockout mice. **Pharmacol Rep**. 2010; 62(6): 1078-89.

REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of AIN -76A rodent diet. **J. Nutr**. 1993; 123: 1939–1951.

REHFELD JF. The new biology of gastrointestinal hormones. **Physiological Reviews**. 1998; 78 (4) 1087–1108.

REUSCH JE, SUSSMAN KE, DRAZNIN B. Inverse relationship between GLUT-4 phosphorylation and its intrinsic activity. **J. Biol. Chem**. 1993; 268: 3348-3351.

RICHTER EA, RUDERMAN NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. **Biochem J**. 2009; 418: 261–275.

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

RODRIGUES MJM. Exercício de natação previne alterações cardiovasculares, bioquímicas e histológicas induzidas por dieta hiperlipídica em ratos Wistar. **Dissertação Mestrado**. Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, 2009.

RUBATTU S, VOLPE M, ENEA I, RUSSO R, ROMANO M, TRIMARCO B. Influence of hypercholesterolemia on adrenal steroid metabolism and eletrolyte balance in spontaneously hypertensive rats. **Endocrinology**. 1993; 133 (5): 2015-2021.

SALTIEL AR, KAHN CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**. 2001; 414: 799-806.

SAMBHI M, WHITE FE. The eletrocardiogram of the normal and hypertensive rat. **Circulation Research**. 1960; 8: 129-134.

SAMPAIO-BARROS MM, FARIAS SILVA E, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Effect of swimming session duration and repetition on metabolic markers in rats. **Stress**. 2003; 6 (2): 127-132.

SCHAFFER S, KANTARTZIS K, MACHANN J, VENTER C, NIESS A, SCHICK F. Lifestyle intervention in individuals with normal versus impaired glucose tolerance. **Eur J Clin Inves**. 2007; 37(7): 535-43.

SCHIMMACK G, DEFRONZO RA, MUSI N. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. **Diabetes Obes Metab**. 2006; 8 (6): 591-602.

SHARMA N, OKERE IC, DUDA MK, CHESS DJ, O'SHEA KM, STANLEY WC. Potential impact of carbohydrate and fat intake on pathological left ventricular hypertrophy. **Cardiovasc Res**. 2007; Jan 15; 73(2): 257-68.

SHAW DI, HALL WL, WILLIAMS CM. Metabolic syndrome: what is it and what are the implications? **Proc Nutr Soc**. 2005; 64: 349-57.

SIMPSON IA, DWYER D, MALIDE D, MOLEY KH, TRAVIS A, VANNUCCI SJ. The facilitative glucose transporter GLUT3, 20 years of distinction. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**. 2008; 295(2): E242-53.

SINGH R, SINGH AP, SINGH M, KRISHAN P. Impact of obesity on hypertension-induced cardiac remodeling: role of oxidative stress and its modulation by gemfibrozil treatment in rats. **Free Radic Biol Med.** 2010; 15; 50 (2): 363-70.

SMITH U. Impaired (“diabetic”) insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance: is insulin resistance initiated in adipose tissue? **Int. J. Obes.** 2002; 6: 897-904.

SPADARI RC, DEMORAES S. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effects of adrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. **Gen. Pharmacol.** 1988; 19: 553-557.

SPEED N, SAUNDERS C, DAVIS AR, OWENS WA, MATTHIES HJ, SAADAT S, KENNEDY JP, VAUGHAN RA, NEVE RL, LINDSLEY CW, RUSSO SJ, DAWS LC, NISWENDER KD, GALLI A. Impaired striatal Akt signaling disrupts dopamine homeostasis and increases feeding. **PLoS One.** 2011; 6(9): e25169.

SRIWIJITKAMOL A, COLETTA DK, WAJCBERG E, BALBONTIN GB, REYNA SM, BARRIENTES J, EAGAN PA, JENKINSON CP, CERSOSIMO E, DEFRONZO RA, SAKAMOTO K, MUSI N. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. **Diabetes.** 2007; 56: 836–848.

STALLKNECHT B, ANDERSEN PH, VINTEN J, BENDTSEN LL, SIBBERSEN J, PEDERSEN O, GALBO H. Effect of physical training on glucose transporter protein and mRNA levels in rat adipocytes. **Am. J. Physiol.** 1993; 265.

STEFANYK LE, GULLI RA, RITCHIE IR, CHABOWSKI A, SNOOK LA, BONEN A, DYCK DJ. Recovered insulin response by 2 weeks of leptin administration in high-fat fed rats is associated with restored AS160 activation and decreased reactive lipid accumulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2011; 301(1): R159-71.

STEINBERG GR, SMITH AC, VAN DENDEREN BJ, CHEN Z, MURTHY S, CAMPBELL DJ, HEIGENHAUSER GJ, DYCK DJ, KEMP BE. AMP-activated protein kinase is not

down-regulated in human skeletal muscle of obese females. **J Clin Endocrinol Metab.** 2004; 89: 4575–4580.

STRIFFLER, JS, NADLER J. Lisofylline, a novel anti-inflammatory agent, enhances glucose-stimulated insulin secretion in vivo and in vitro: studies in prediabetics and normal rats. **Metabolism.** 2004; 53: 290-296.

STUART CA, YIN D, HOWELL ME, DYKES RJ, LAFFAN JJ & FERRANDO AA. Hexose transporter mRNA for GLUT 4, GLUT 5 e GLUT 12 predominate in human muscle. **Am. J. Physiol.Endocrinol. Metab.** 2006; 291: E1067-E1073.

SUH S, JEONG IK, KIM MY, KIM YS, SHIN S, KIM SS, KIM JH. Effects of resistance training and aerobic exercise on insulin sensitivity in overweight korean adolescents: a controlled randomized trial. **Diabetes Metab J.** 2011; 35(4): 418-26.

SUNDELL J. Resistance training is an effective tool against metabolic and frailty syndromes. **Adv Prev Med.** 2011; 984683.

SURWIT RS, DIXON TM, PETRO AE, DANIEL KW, COLLINS S. Diazoxide restores beta3-adrenergic receptor function in diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology.** 2000; 141(10): 3630-7.

SUSINI C, LAVAU M, HERZOG J. Adrenaline responsiveness of glucose metabolism in insulin-resistant adipose tissue of rats fed a high fat diet. **Biochem J.** 1979; 180: 431-433.

SUZUKI K, JAYASENA CN, BLOOM SR. The gut hormones in appetite regulation. **J. Obes.** 2011; 2011: 528401.

TAKEDA A, KIDO Y, HASHIMOTO N, NODA T, KASUGA M. Pancreatic beta cell mass preserved in heterozygous PDK1 knockout mice. **Kobe J Med Sci.** 2008; Sep 5; 54(3): E183-90.

TAKEMURA N, OKUBO T, SONOYAMA K. Lactobacillus plantarum strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. **Exp Biol Med.** 2010; 235(7): 849-56.

TANINDI A, OLGUN H, TUNCEL A, CELIK B, PASAOGLU H, BOYACI B. Exercise electrocardiographic responses and serum cystatin C levels among metabolic syndrome patients without overt diabetes mellitus. **Vasc Health Risk Manag.** 2011; 7: 59-65.

TAYLOR WM, HALPERIN ML. Stimulation of glucose transport in rat adipocytes by insulin, adenosine, nicotinic acid and hydrogen peroxide. **Biochem. J.** 1979; 178, p.381-389.

TEPPERMAN HM, DEWITT J, TEPPERMAN J. Effect of a high fat diet on rat adipocyte lipolysis: responses to epinephrine, forskolin, methylisobutylxanthine, dibutyryl cyclic AMP, insulin and nicotinic acid. **J Nutr.** 1986; 116(10): 1984-91.

THACKERAY JT, PARSA-NEZHAD M, KENK M, THORN SL, KOLAJOVA M, BEANLANDS RS, DASILVA JN. Reduced CGP12177 binding to cardiac β -adrenoceptors in hyperglycemic high-fat-diet-fed, streptozotocin-induced diabetic rats. **Nucl Med Biol.** 2011; 38 (7): 1059-66.

THAYLER JF, YAMAMOTO SS, BROSSCHOT JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. **Int. J. Cardiol.** 2010; 141, 122–131.

THORENS B. Molecular and cellular physiology of GLUT2, a high-K_m facilitated diffusion glucose transporter. **Int Rev Cytol.** 1992; 137A: 209–238.

THORENS B, MUECKLER M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2010; 298(2):E141-5.

TIAN J, DANG HN, YONG J, CHUI WS, DIZON MP, YAW CK, KAUFMAN DL. Oral treatment with γ -aminobutyric acid improves glucose tolerance and insulin sensitivity by inhibiting inflammation in high fat diet-fed mice. **PLoS One.** 2011; 6(9): e25338.

TOWLER MC, HARDIE DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. **Circ.Res.** 2007; 100: 328-341.

UENO M, CARVALHEIRA JB, TAMBASCIA RC, BEZERRA RM, AMARAL ME, CARNEIRO EM, FOLLI F, FRANCHINI KG, SAAD MJ. Regulation of insulin signalling by hyperinsulinemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. **Diabetologia**. 2005; 48: 506–518.

Van DIEREN S, BEULENS JW, Van der SCHOUW YT, GROBBEE DE, NEAL B. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**. 2010; 17 Suppl 1: S3-8.

VARGOVIC P, UKROPEC J, LAUKOVA M, CLEARY S, MANZ B, PACAK K, KVETNANSKY R. Adipocytes as a new source of catecholamine production. **FEBS Lett**. 2011 Jul 21; 585(14): 2279-84.

VERAGO JL, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 2001; 34 (9): 1197-1207.

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.

VICKERS MH. Developmental programming of the metabolic syndrome - critical windows for intervention. **World J Diabetes**. 2011; Sep 15; 2(9): 137-48.

Von DIEMEN V, TRINDADE EN, TRINDADE MR. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cir Bras**. 2006; 21(6): 425-9.

WALD NJ, LAW MR. Serum cholesterol and ischaemic heart disease. **Atherosclerosis**. 1995; 118: S1-S5.

WALLBERG-HENRIKSSON H, RINCON J, ZIERATH JR. Exercise in the management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Sports Med**. 1998; 25(1): 25-35.

WANG ZQ, ZUBERI AR, ZHANG XH, MACGOWAN J, QIN J, YE X, SON L, WU Q, LIAN K, CEFALU WT. Effects of dietary fibers on weight gain, carbohydrate metabolism,

and gastric ghrelin gene expression in mice fed a high-fat diet. **Metabolism**. 2007; 56(12): 1635-42.

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

WATANABE S, HOJO M, NAGAHARA A. Metabolic syndrome and gastrointestinal diseases. **J Gastroenterol**. 2007; 42: 267-74.

WILSON MG, CHANDRA N, PAPADAKIS M, O'HANLON R, PRASAD SK, SHARMA S. Hypertrophic Cardiomyopathy and Ultra-Endurance Running: Two Incompatible Entities? **J Cardiovasc Magn Reson**. 2011; 29; 13(1): 77.

WINDER WW, HARDIE DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. **Am J Physiol**. 1999; 277(1 Pt 1): E1-10.

WOJTASZEWSKI JF, RICHTER EA. Effects of acute exercise and training on insulin action and sensitivity: focus on molecular mechanisms in muscle. **Essays Biochem**. 2006; 42: 31-46.

WOLF-NUNES V, MIOTTO AM, FARIAS-SILVA E, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Plasmatic levels of cholesterol, triglycerides and glucose of normo- and hypercholesterolemic rats treated whit Croton cajucara Benth In: **XVI Latinamerican Congress of Pharmacology**. 2000.

WOLF-NUNES V. Efeito do tratamento com infuso de Croton cajucara Benth em ratos wistar jovens e adultos normo ou hiperlipidêmicos. **Tese de Doutorado**. Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia. Instituto de Biologia-UNICAMP, 2004.

WONG ND, WILSON PW, KANNEL WB. Serum cholesterol as a prognostic factor after myocardial infarction: the Framingham Study. **Ann Intern Med**. 1991; Nov 1; 115(9): 687-93.

XUE HL, ZHANG Z, WANG WJ, CHEN WH, YING J. Effects of Chinese herbal medicine Yiqi Zengmin formula on expression of glucose transporter 4 in skeletal muscle in type 2 diabetic rats. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.** 2011; 9(10): 1133-7.

YAO J, ZHI M, MINHU C. Effect of silybin on high-fat-induced fatty liver in rats. **Braz J Med Biol Res.** 2011; 44(7): 652-9.

YKI-JARVINEN H, BOGARDUS C, FOLEY JE. Regulation of plasma lactate concentration in resting human subjects. **Metabolism.** 1990; 39(8), p. 859-864.

ZAREBA W, MOSS AJ, Le CESSIE S. Dispersion of ventricular repolarization and arrhythmic cardiac death in coronary artery disease. **Am J Cardiol.** 1994; 15; 74(6): 550-3.

ZECHNER R, KIENESBERGER PC, HAEMMERLE G, ZIMMERMANN R, LASS A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. **J Lipid Res.** 2009; 50(1): 3-21.

ZHANG D, CHRISTIANSON J, LIU ZX, TIAN L, CHOI CS, NESCHEN S, DONG J, WOOD PA, SHULMAN GI. Resistance to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Cell Metab.** 2010; 5; 11(5): 402-11.

ZHANG J, WRIGHT W, BERNLOHR DA, CUSHMAN SW, CHEN X. Alterations of the classic pathway of complement in adipose tissue of obesity and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2007; 292(5): 1433-40.

ZHONG H, MINNEMAN KP. α_1 -Adrenoceptor subtypes. **Eur. J. Pharmacol.** 1999; 340: 45-52.

ZHONG JK, GUO ZG, LI C, WANG ZK, LAI WY, TU Y. Probucol alleviates atherosclerosis and improves high density lipoprotein function. **Lipids Health Dis.** 2011; Nov 12; 10(1): 210.

ZORZANO A, PALACÍN M, GUMÀ A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. **Acta Physiol Scand.** 2005; 183(1):43-58.

ZOU MH, KIRKPATRICK SS, DAVIS BJ, NELSON JS, WILES WG 4TH, SCHLATTNER U, NEUMANN D, BROWNLEE M, FREEMAN MB, GOLDMAN MH. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. **J Biol Chem.** 2004; 15, 279(42): 43940-51.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada: "Análise do perfil metabólico e cardiovascular de ratos alimentados com dieta hiperlipídica por quatro semanas".

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.


Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 2561-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Danilo Roberto Xavier de Oliveira Crege


Orientador: Dora Maria Grassi Kassisse

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura