



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARCELA PALOMO PIERONI BELLENZANI

**“EXPRESSÃO DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE
TRIACILGLICEROL EM TECIDOS ADIPOSE E HEPÁTICO
ISOLADOS DE RATOS NORMO E HIPERLIPIDÊMICOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Marcela Palomo Pieroni
Bellenzani
e aprovada pela Comissão Julgadora.
[Assinatura]

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

Orientadora: Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis

Campinas, 2012

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

B416e	<p>Bellenzani, Marcela Palomo Pieroni, 1984- Expressão de enzimas envolvidas na produção de triacilglicerol em tecidos adiposo e hepático isolados de ratos normo e hiperlipidêmicos / Marcela Palomo Pieroni Bellenzani. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Dora Maria Grassi Kassisse. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Rato. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Adipócitos. 4. Fígado – Células e tecidos. 5. Triglicerídeos. I. Grassi-Kassisse, Dora Maria, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Expression of enzymes involved in the production of triacylglycerol in adipose and liver isolated tissue from normo and hyperlipidemic rats

Palavras-chave em Inglês:

Rats

Hig-fat diet

Adipocytes

Liver - Cells and tissues

Triglycerides

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Dora Maria Grassi Kassisse [Orientador]

Fernanda Ramos Gadelha

Felix Guillermo Reyes Reyes

Data da defesa: 15-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 15 de Fevereiro de 2012

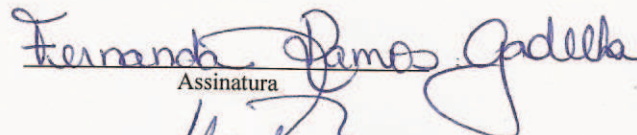
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis (Orientadora)



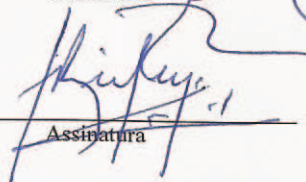
Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha



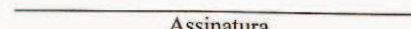
Assinatura

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes



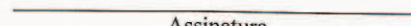
Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



Assinatura

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto



Assinatura

Para aquelas pessoas que me fazem sorrir; que fazem a diferença em minha vida; que quando olho pra trás, sinto muitas saudades... Para aquelas que estiveram junto a mim quando eu não estava disposta; que me aconselharam quando me senti sozinha, e me ajudaram a entender que não importa o problema, o mundo não irá parar para que eu o conserte... Para as pessoas que me deram uma força quando eu não estava muito animada e me impulsionaram quando pensei em desistir... Para aquelas que amei, que abracei... Para as que encontro apenas em meus sonhos... Para as pessoas que encontro todos os dias e não tenho a chance de dizer tudo o que eu sinto olhando nos olhos... Para mim... Para você meu amor... que representa um pouco de tudo isso e ainda aguenta minha teimosia! O que importa nessa vida não é o que tenho, mas sim QUEM eu tenho!

AGRADECIMENTOS

À todos aqueles que em algum momento dessa longa caminhada me desencorajaram com pensamentos pessimistas e falta de fé o meu muito obrigada! Foram todas essas palavras que me fortaleceram e me impulsionaram me fazendo ir adiante. Passar por dificuldades, obstáculos e descrença fez parte dessa jornada quase que dia a dia. Porém Deus coloca em nosso caminho pessoas certas no momento certo.

Agradeço ao Guto, que durante o último ano da faculdade de Fisioterapia seguia para os estágios sempre acompanhado de seu Guyton estudando para prova de mestrado que me despertou tanto interesse! Ao TIM, por ter me aberto as portas do Labeest sempre com muita paciência para me ensinar cada passo do novo mundo científico que estava se abrindo diante de mim. Ao Danilo, por me abrir os olhos para as dificuldades que viriam e sempre esteve pronto aos meus e-mails urgentíssimos.

À minha amiga Larissa que dividiu comigo cada angústia, cada vitória entrando no mestrado junto comigo. Obrigada Lari, por cada momento vivido durante esses três anos. Tenho certeza que tudo foi mais fácil com a sua calma e sua maneira centrada de ver as coisas mesmo quando tudo parecia desespero.

Aliás, hoje, amizade é sinônimo de Labeest. Obrigada pela amizade e pelos quebra-galhos Aline, Ana Gabriela, Gustavo, Luís, Fernanda e Prof. Miguel. Com certeza todos vocês participaram desse projeto e foram essenciais para que ele chegasse ao fim.

Agradeço a disponibilidade e atenção da Profa. Denise, Profa. Luciana e do Prof. Marcelo Lancellotti no início do desenvolvimento de trabalho. Ao Prof. Lício por ter aberto as portas de seu laboratório no Gastrocentro para que pudéssemos realizar nossos experimentos e à sua

orientanda Josi por ter nos ensinado cada passo, tirado todas as nossas dúvidas, atendido nossos telefonemas ansiosos enfim obrigada por tudo.

Por fim um agradecimento mais que especial a minha orientadora Profa Dora que além de uma profissional na qual eu me espelho se tornou amiga, conselheira e com uma garra incrível para lutar por seus orientandos fez com que esse projeto chegasse ao seu ponto final.

À minha família que sempre me encorajou, meu pai Arthur e minha mãe Vera por todos os esforços e sacrifícios para que eu pudesse conquistar mais essa etapa, minhas irmãs Rafaela e Belinha que vivenciaram comigo infindáveis momentos de estudo, ao meu namorado hoje marido Rodrigo que soube entender os momentos de recolhimento, todo o estresse e mesmo assim esteve ao meu lado sempre, e Deus! A este eu não tenho palavras para agradecer. Tudo posso naquele que me fortalece.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas _____	viii
Lista de Tabelas _____	ix
Lista de Figuras _____	x
Resumo _____	xvi
Abstract _____	xviii
1. INTRODUÇÃO _____	1
2. OBJETIVOS _____	12
2.1 Objetivo Geral _____	12
2.2 Objetivo Específico _____	12
3. MATERIAL E MÉTODOS _____	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	21
<i>4.1 Caracterização do modelo de dislipidemia em ratos</i> _____	21
4.1.1 Ganho de peso e consumo alimentar e calórico _____	21
4.1.2 Análises plasmáticas _____	24
4.1.3 Análise morfológica e histológica do tecido hepático _____	35
<i>4.2 Análise da expressão gênica por qRT-PCR</i> _____	37
<i>4.2.1 Análise da expressão gênica de enzimas no tecido hepático</i> _____	39
4.2.1.1 LPL Hepática _____	39
4.2.1.2 G6PC Hepática _____	41
4.2.1.3 PDK4 e PFK1 Hepática _____	43
4.2.1.4 Acaca Hepática _____	50
4.2.1.5 GyK Hepática _____	52
4.2.1.6 PDP2 Hepática _____	55
<i>4.2.2 Análise da expressão gênica de enzimas no tecido adiposo</i> _____	60
4.2.2.1 HSL no tecido adiposo _____	63
4.2.2.2 LPL no tecido adiposo _____	69
4.2.2.3 PDK4 e PDP2 no tecido adiposo _____	72
4.2.2.4 Acaca no tecido adiposo _____	77
5. CONCLUSÕES _____	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	83

LISTA DE ABREVIATURAS

qRT-PCR – Reação quantitativa da polimerase em cadeia em tempo real
cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar
LPL – Lipoproteína lipase
PDK4 – Piruvato desidrogenase kinase 4
PFK1 – 6-fosfofrutoquinase
G6PC – glicose 6-fosfatase
Acaca – Acatil-CoA carboxilase alpha
GyK – Glicerolquinase
PDP2 – Piruvato desidrogenase fosfatase 2
HSL – Lipase hormônio-sensível
ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
PDH – Piruvato desidrogenase
AGLs – Ácidos graxos livres
CPD – Complexo piruvato desidrogenase
BSA – Albumina sérica bovina
KRBA – Krebs-Ringer bicarbonato albumina
GAPD – Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade
HDL – Lipoproteína de alta densidade
CRH – Hormônio liberador de corticotropina
PPAR – Receptores ativadores por proliferadores de peroxissomas
AQP – Aquaporina
CPT-1 – Carnitina palmitoiltransferase
PEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
ATGL – Lipase de triacilglicerídeos adiposo
MAGL – Lipase de monoacilglicerol
DAG – Diacilglicerol
AGNE – Ácidos graxos não esterificados
TNF- α – Fator de necrose tumoral alpha
TAB – Tecido adiposo branco

LISTA DE TABELAS

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 et al., 1993). Densidade calórica = 5,36 cal/g.....14

Tabela 2

Concentrações plasmáticas de ratos controle e submetidos a dieta hiperlipídica. As análises foram realizadas com auxílio de fitas dosadoras e submetidas à leitura em aparelho da Accutrend® (Roche Diagnostics D-68298, Mannheim, Germany). O sangue foi coletado por punção cardíaca em ratos após jejum de 16h, sob anestesia.....24

Tabela 3

Análise das amostras de RNA extraídas das amostras de tecido adiposo epididimal, mesentérico e Peri-renal e de tecido hepático de animais controle e dieta por Nanodrop.....38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1

Análise da ingesta alimentar e ganho de peso de ratos controle (C) e tratados com dieta hiperlipídica (D). A dieta foi oferecida *ad libitum* ao longo de 4 semanas aos ratos que permaneceram em gaiolas coletivas (3 ratos por gaiola). O peso, em gramas (g), dos ratos foi quantificado diariamente e o consumo de ração três vezes por semana. PI: peso inicial. C_PF: Peso Final dos ratos Controle. D_PF: Peso Final dos ratos Dieta. C_Ganho: ganho de peso dos ratos Controle. D_Ganho: ganho de peso dos ratos Dieta. C_Ingesta: Média diária de ingesta de ração dos ratos Controle. D_Ingesta: Média diária de ingesta de ração dos ratos Dieta. * $p < 0,05$ em relação ao PI; # $p < 0,001$ Ingesta diária dos ratos Controle vs ingesta diária dos ratos Dieta. n=5.....23

Figura 2

Foto ilustrativa do tecido hepático de ratos controle (a) e submetidos a dieta hiperlipídica (b) ao longo de 4 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).....35

Figura 3

Fotomicrografia de cortes histológicos de tecido hepático retirado de ratos tratados com dieta padrão (A e C) e ratos tratados com dieta hiperlipídica por 4 semanas (B e D), sendo A e B coradas com hematoxilina e eosina enquanto C e D coradas com Sudan Black B.....36

Figura 4

Gel de integridade das amostras de RNA extraídas das amostras de tecido adiposo epididimal, mesentérico e Peri-renal e tecido hepático de animais controle e dieta. (DRD: animal dieta Peri-renal direito; CRD: animal controle Peri-renal direito; DM1: animal dieta amostra 1 do mesentérico; CM1: animal controle amostra 1 do mesentérico; DED: animal dieta epididimal direito; CED: animal controle epididimal direito; DHS: animal dieta hepático superior; CHS: animal controle hepático superior). Os números em frente as identificações indicam o número de marcas existentes no rabo do animal para identificação do mesmo.....37

Figura 5

Expressão gênica da enzima *LPL* em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $p < 0,05$ - teste *t* Student. n = 6.....41

Figura 6

Expressão gênica da enzima **G6PC** em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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) * $p < 0,05$ - teste t Student. $n = 6$42

Figura 7

Expressão gênica das enzimas **PDK4 e PFK1** em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $p < 0,05$ - teste t Student. $n = 6$49

Figura 8

Regulação do Complexo Piruvato Desidrogenase (CPD) e suas quinases (PDKs) e fosfatase (PDPs). DCA: dicloroacetato; Lipoic acid: ácido lipóico; Insulin: insulina; Fatty acids and glucorticoids: ácidos graxos e glicocorticóides; Starvation and diabetes: Estado de fome e diabetes; Inactive: inativo; Pyruvate: piruvato; Active: ativo; Acetyl-CoA: acetil-CoA. Adaptado de Jeoung et al., 2010.....49

Figura 9

Expressão gênica da enzima **Acaca** em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). $n = 6$51

Figura 10

Expressão gênica da enzima **GyK** em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). $n = 6$54

Figura 11

Participação de AQP9 na gliconeogênese hepática e esteatose. Durante o jejum, os adipócitos induzem a liberação de glicerol através AQP3 e AQP7 enquanto hepatócitos favorecem a captação de glicerol através

AQP9. Glicerol é fosforilado por GK para produzir glicerol-3-fosfato, um precursor da gliconeogênese e uma fonte direta de glicerol-3-fosfato para a síntese de novos triacilgliceróis. Regulação coordenada pelas aquagliceroporinas adiposa e hepática é necessária para manter um equilíbrio correto entre acúmulo de gordura, gliconeogênese hepática e esteatose. FFA, ácidos graxos livres; GK, glicerol quinase, transportador de glicose GLUT; PC, piruvato carboxilase; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPCK, carboxicinase fosfoenolpiruvato; TAG, triacilgliceróis; Insulin: insulina; Glycogen: glicogênio; Pyruvate: piruvato; Oxaloacetate: oxaloacetato; Gluconeogenesis: gliconeogênese; Glucose: glicose; Glycerol: glicerol; Glycerol 3-P: glicerol 3-fosfato; Adipocyte: adipócitos. Adaptado de RODRIGUEZ, 2011.....55

Figura 12

Expressão gênica da enzima *PDP2* em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $p < 0,05$ - teste *t* Student. n = 6.....57

Figura 13

Esquema resumido das alterações apresentadas na expressão gênica das enzimas em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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).....59

Figura 14

Fotomicrografia de adipócitos isolados das regiões epididimal (a, d), peri-renal (b, e) e mesentérica (c, f) de ratos controle (painéis superiores) e de ratos ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas (painéis inferiores). Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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).....61

Figura 15

Morfometria de adipócitos isolados do pânículo adiposo da região epididimal, mesentérica e Peri-renal de ratos controle e de ratos que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. A morfometria foi avaliada pela análise da área (a) e diâmetro (b) dos adipócitos isolados. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Labina-Purina, Brasil e a ração

hiperlipídica 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). Controle vs dieta - test t ns. Diferentes depósitos em um mesmo grupo: Anova seguida de Tukey. * PR vs M $p < 0,05$ controle e * PR vs Epididimal $p < 0,05$ controle. # PR vs M $p < 0,05$ dieta e * PR vs Epididimal $p < 0,05$ dieta.....62

Figura 16

Resumo dos efeitos da HFD em lipólise dos adipócitos e metabolismo. Setas representam supra ou subregulação da atividade, conteúdo de proteína e / ou expressão. Linhas sem setas indicam inibição. Sob HFD, o efeito das catecolaminas na cascata de sinalização β -adrenérgica (β -AR) por meio da ativação reduzida do receptor de proteína G estimuladora acoplado (Gs). Isto reduz a ativação da proteína quinase A (PKA) e inibe a fosforilação da lipase hormônio-sensível (HSL). HFD também supraregula a expressão da tecido adiposo fosfolipase A2 (AdPLA2), que tem sido demonstrada pelo aumento da produção de prostaglandina E2 (PGE2), o ligante primário para o E-3 prostanóides receptor (EP3). Uma vez EP3 acoplado a uma proteína G inibitória (Gi), a ativação desse receptor inibe ainda mais PKA em condições HFD. Aumento do conteúdo e identificação ATGL-58 gene comparativa (CGI-58). A expressão também ocorre com HFD para facilitar a quebra TAG, embora subsequente diminuição HSL fosforilação / atividade resulte no acúmulo de DAG. HFD induz a diminuição do conteúdo de perilipinas (Peri) também parece contribuir para a lipólise disfuncional nestas células. Redução do conteúdo/ fosforilação de AMPK por HFD está em linha com a oxidação e supressão da ACC. A capacidade oxidativa dos adipócitos é diminuída com HFD, que é compatível com a supressão dos reguladores da biogênese mitocondrial, como peroxisoma proliferador-ativado receptor- γ (PPAR- γ) coativador-1 α (PGC-1 α) e expressão de PPAR- α . AC, a adenilato ciclase; AA, o ácido araquidônico; fosfatidilcolina PC,; PM, membrana plasmática; FA, ácidos graxos; MAG; monoacilglicerol; magl, MAG lipase; Mito, mitocôndrias. Adaptado de Gaidhu et al., 2010.....67

Figura 17

Expressão gênica da enzima **HSL** em tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $P < 0,05$ - teste *t* Student.....69

Figura 18

Expressão gênica da enzima **LPL** em tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle

ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $p < 0,05$ peri-renal dieta vs peri-renal controle - teste t Student. $n = 6$80

Figura 19

Expressão gênica da enzima ***PDK4*** em tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $p < 0,05$ - teste t Student. $n = 6$75

Figura 20

Expressão gênica da enzima ***PDP2*** em tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $p < 0,05$ - teste t Student. $n = 6$76

Figura 21

Expressão gênica da enzima ***Acaca*** em tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). $n = 6$77

Figura 22

Esquema resumido das alterações apresentadas na expressão gênica das enzimas em tecido adiposo isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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).....81

RESUMO

A pandemia da obesidade é evidente no início do século XXI. O fator desencadeante mais relevante é a alimentação hipercalórica associada ao sedentarismo. Modelos de estudo em ratos para investigar as etapas que precedem o desenvolvimento desta doença são fundamentais para propor terapias de prevenção. No modelo de indução da dislipidemia pela dieta por quatro semanas, os ratos apresentam hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia e com seis semanas de administração da dieta observa-se um aumento no peso dos panículos adiposos da região epididimal e peri-renal e sem alteração no depósito da região mesentérica. Assim sendo, objetivamos, nesta tese, analisar as vias metabólicas envolvidas no processo de metabolização da glicose e triacilgliceróis nos tecidos adiposo branco e hepático em ratos hiperlipidêmicos e para tal estudamos as vias lipogênica, lipolítica e neoglicogênica, pela quantificação da expressão gênica das enzimas chaves envolvidas nestes processos. A dislipidemia foi induzida pelo oferecimento de dieta hiperlipídica (grupo dieta, D) ao longo de quatro semanas a ratos jovens e a instalação do quadro foi verificada pelas análises plasmáticas ao final do tratamento e após jejum de 16h. Amostras de tecidos hepático e adiposo foram coletadas para análise histológica e quantificação da expressão gênica sendo estas analisadas por qRT-PCR. Observou-se que ratos que ingerem dieta hiperlipídica (+129±10,13 g) ganham peso de forma semelhante aos ratos controle (C: +148±8,8 g) mesmo ingerindo quantidade significativamente menor de dieta (C: 20,8±0,62 g vs D: 14,87±0,66 g). As análises histológicas ilustram aumento no teor de depósitos de lipídeos no tecido hepático. A expressão gênica no tecido hepático de ratos dieta foi aumentada significativamente para as enzimas lipoproteína lipase, piruvato desidrogenase quinase 4 e fosfofrutoquinase 1 e diminuição significativa na expressão de glicose 6-fosfatase sem alteração na quantificação da expressão de acetil-CoA

carboxilase alpha, gliceroquinase, piruvato desidrogenase fosfatase 2. Em relação ao tecido adiposo observamos que a expressão das enzimas acetil-CoA carboxilase e piruvato desidrogenase fosfatase 2 não foi significativamente alterada em nenhum dos depósitos adiposos. A lipase hormônio-sensível não apresentou alterações no tecido adiposo epididimal, porém teve sua expressão significativamente aumentada nos tecidos mesentérico e peri-renal. A expressão da lipoproteína lipase por sua vez, não se alterou no panículo adiposo epididimal nem no panículo adiposo mesentérico estando diminuída no panículo adiposo peri-renal. E por fim, a piruvato desidrogenase quinase 4 também não apresentou alterações nos depósitos epididimal e mesentérico porém no peri-renal sua expressão encontrou-se aumentada. Estes resultados, em conjunto, indicam que a dieta administrada por 4 semanas, mesmo não apresentando todas as alterações observadas com 6 semanas, pode ser útil para os estudos iniciais do quadro de dislipidemia que antecede as disfunções metabólicas.

Palavras chaves: ratos, dieta hiperlipídica, adipócitos, tecido hepático, enzimas das vias glicolítica, gliconeogênica, lipolítica e lipogênica.

ABSTRACT

The pandemic of obesity is evident in the twenty-first century. The most important and triggering factor is the high-calorie diet associated with physical inactivity. Study models in rats to investigate the steps that precede the development of this disease are essential to propose preventive therapies. In the model of induction of dyslipidemia by diet for four weeks, the mice exhibit hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and hyperinsulinemia and there is an increase in weight of the panniculus region of epididymal and peri-renal depot and no change in the mesenteric region. Therefore, we aimed to analyze the metabolic pathways involved in the metabolism of glucose and triglycerides in white adipose tissue, and liver in hyperlipidemic rats and to study the ways that lipogenic, lipolytic and glyconeogenic for the quantification of gene expression of key enzymes involved in these processes. Dyslipidemia was induced by offering high-fat diet (diet group, D) over four weeks to young rats and onset of condition was verified by analysis at the end of the plasma treatment and after fasting for 16 hours. Samples of liver and adipose tissue were collected for histological analysis and quantification of gene expression and these were analyzed by qRT-PCR. It was observed that mice eat high-fat diet (+129 ±10.13 g) gain weight similarly to control rats (C: +8.8 ±148 g) even eating significantly less diet (C: 20.8 ±0.62 g vs D: 14.87 ±0.66 g). Histological analysis illustrate the content of lipid deposits in liver tissue. Gene expression in liver tissue of rats diet was significantly increased for the enzymes lipoprotein lipase, pyruvate dehydrogenase kinase 4 and 1 and Phosphofructokinase significant decrease in the expression of glucose 6-phosphatase no change in the quantification of the expression of acetyl-CoA carboxylase alpha, Glicerokinase, pyruvate dehydrogenase phosphatase 2. In relation to the adipose tissue we observed that the expression of the enzyme acetyl-CoA carboxylase and pyruvate dehydrogenase phosphatase 2 was not significantly altered

in any of the fatty deposits. The hormone-sensitive lipase showed no changes in epididymal adipose tissue but its expression was significantly increased in mesenteric tissue and peri-renal. Lipoprotein lipase, in turn, did not change in the mesenteric or epididymal being reduced in the peri-renal. And finally, the pyruvate dehydrogenase kinase 4 also showed no changes in epididymal and mesenteric but the peri-renal expression is increased. These results, together, indicate that the diet for 4 weeks, even not showing all changes observed within 6 weeks, can be useful for the initial studies of hyperlipidemia that precede the metabolic dysfunctions.

Key words: rats, high-fat diet, adipocytes, liver tissue, glycolytic, glyconeogenic, lipolytic and lipogenic pathway enzymes

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, predominaram entre nós as chamadas doenças transmissíveis decorrentes de agentes vivos como vírus, bactérias e parasitas responsáveis pela paralisia infantil, tuberculose e verminoses intestinais. Porém, as transições demográficas, nutricionais e epidemiológicas ocorridas no século passado determinaram um perfil de risco em que doenças crônicas assumiram ônus crescente e preocupante. Trata-se de condições prevalentes e importantes problemas de saúde pública em todos os países, independentemente de seu grau de desenvolvimento. Entre elas, destacam-se a obesidade, as doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e o diabetes mellitus (DM) (VERMELHO et al., 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; DIAS & CAMPOS, 2008).

A importância das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no perfil atual de saúde das populações é extremamente relevante. Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que estas já são responsáveis por 58,5% de todas as mortes e por 45,9% da carga global total de doenças expressa por anos perdidos de vida saudável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; DIAS & CAMPOS, 2008). No Brasil, correspondem a 66,3% do total de doenças do país (SCHRAMM et al., 2004).

A obesidade representa o problema nutricional de maior ascensão nos últimos anos, sendo considerada uma pandemia e conseqüentemente um dos maiores problemas de saúde pública, pois, além da alta prevalência, configura-se como fator de risco, desencadeador de diversas doenças crônico-degenerativas como a hipertensão, a dislipidemia, o diabetes mellitus tipo II e as doenças cardiovasculares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; CATTAI et al., 2008).

Este fato é bastante preocupante, pois implica em elevados recursos financeiros destinados ao tratamento da mesma e de doenças associadas ou decorrentes (DIAS et al., 2008). Estima-se que no Brasil são gastos cerca de 1,5 bilhões de reais por ano com internações

hospitalares, consultas médicas e medicamentos relacionados à obesidade. Desse total, 600 milhões são provenientes do Governo via Sistema Único de Saúde, e representa 12% do orçamento gasto com todas as outras doenças. Estes fatos explicam a importância e o impacto da doença, no âmbito individual e coletivo (LAMOUNIERE & PARIZZI, 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO, 2011) a obesidade é definida como acúmulo excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde. Pode ser classificada em sobrepeso, obesidade grau I, grau II e grau III. Normalmente é utilizada para esta classificação uma medida simples expressa em Kg/m^2 denominada IMC (índice de massa corporal). Esta é calculada como a razão do peso, em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura em metros. Utilizando esta medida a OMS considera IMC entre 25 e 29,9 Kg/m^2 como sobrepeso, entre 30 e 34,9 Kg/m^2 como obesidade grau I, entre 35 e 39,9 Kg/m^2 como obesidade grau II e acima de 39,9 Kg/m^2 como obesidade grau III (IGNACIO, 2008). Sugestões de alterações nestes indicadores como, por exemplo, para a relação cintura quadril e mais recentemente apenas a circunferência da cintura tem sido propostas como indicadores de riscos de doenças cardiovasculares e metabólicas, entretanto o IMC é ainda considerado a medida para definição do grau de obesidade.

Atualmente existem aproximadamente 1.6 bilhões de adultos (15 anos ou mais) que apresentam sobrepeso e pelo menos 400 milhões são obesos; entre as crianças de até 5 anos, 20 milhões estão acima do peso. Estima-se que em 2015, aproximadamente 2.3 bilhões de adultos estejam acima do peso dos quais 700 milhões serão obesos (IGNACIO, 2008).

Apesar de a obesidade ser decorrente de alterações endócrinas e/ou genéticas, o fator ambiental hoje, é o prevalente. Podemos considerar que a causa fundamental da obesidade é o desbalanço energético entre calorias consumidas e gastas, ou seja, um desequilíbrio no metabolismo energético. Entre os principais fatores estão incluídos: a mudança global na dieta,

com aumento no consumo de alimentos ricos em gordura e açúcar e pobres em vitaminas, minerais e outros micronutrientes, associados a um decréscimo na prática de atividade física devido ao caráter sedentário de diversos tipos de trabalho, mudanças no tipo de transporte e aumento da urbanização (WHO, 2006).

Assim um estilo de vida sedentário e alimentação hipercalórica, característico do estilo de vida ocidental, viabilizam a obesidade e as doenças crônico-degenerativas comprometendo a integridade funcional dos sistemas responsáveis pelo equilíbrio interno (GONÇALVES et al., 1997).

Entretanto, mesmo antes do quadro de obesidade se instalar, alterações lipídicas e teciduais (hepática e do tecido adiposo branco) estão presentes aumentando os riscos de doenças metabólicas frente à ingestão excessiva de calorias associada ao sedentarismo (WAKI & TONTONNOZ, 2007).

A síndrome metabólica nada mais é do que um aglomerado de doenças desencadeadas por desordens associadas à insulina e ao metabolismo lipídico tais como hiperinsulinemia, diabetes mellitus não dependente de insulina (tipo II), obesidade, aterosclerose, hipertensão e dislipidemia (WAKI & TONTONNOZ, 2007).

Numerosos estudos experimentais, epidemiológicos, ensaios clínicos e metanálises estabeleceram claramente a associação entre dislipidemia e aumento do risco de morte.

A hiperlipidemia é o quadro clínico no qual as concentrações plasmáticas de colesterol total e/ou suas frações e de triacilgliceróis estão acima da faixa considerada normal. Esta dislipidemia pode ter origem primária, quando oriunda de predisposição genética; ou ser de origem secundária, desenvolvida a partir de condições ambientais como, por exemplo, uma dieta desbalanceada e o sedentarismo; pode, ainda, ser uma consequência da combinação de ambas (GINSBERG, 1990; HAVEL & KANE, 1995). Na dislipidemia secundária ou ambiental, o

consumo de dieta contendo quantidade de gordura acima do recomendado (principalmente saturada) altera a composição dos lipídios sanguíneos favorecendo o desenvolvimento de hiperlipidemias (BRUMMELEN, 1983; HOWARD & HANNAH, 1995; HAVEL & KANE, 1995).

Estudos em modelos animais são fundamentais para o esclarecimento da evolução das doenças que são decorrentes da alimentação inadequada. Nosso laboratório vem investigando a indução da dislipidemia em ratos pela dieta desde 1996. Inicialmente a proposta foi estudar um composto vegetal com propriedade hipocolesterolêmica. Foi então desenvolvido um protocolo de indução de dislipidemia pela dieta, em ratos, e uma vez hiperlipidêmicos, os ratos foram tratados com o infuso da *Croton cajucara* ao longo de 15 dias. Neste modelo de dislipidemia os ratos após ingestão de dieta hiperlipídica durante 4 semanas apresentaram hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia alterações estas associadas à esteatose hepática sem, portanto qualquer alteração no peso corporal destes ratos. A continuidade da administração da dieta associada ao tratamento com o infuso a 5 e 10% de *Croton cajucara* durante quinze dias não alterou o perfil lipídico e os danos hepáticos (WOLF-NUNES, 2004).

Em ratos que ingeriram a dieta hiperlipídica por seis semanas também foram estudados os depósitos de gordura dos panículos adiposos epididimal, peri-renal e mesentérico. Em relação às alterações nos depósitos de gordura, observou-se aumento significativo no peso dos panículos adiposos da região epididimal e peri-renal e sem alteração no peso do depósito de gordura da região mesentérica (WOLF-NUNES, 2004).

O aumento de peso do pânículo adiposo está relacionado tanto ao aumento no volume como no número de adipócitos; o estímulo para induzir aumento no número está relacionado ao aumento no tamanho dos adipócitos (BJORNTORP et al., 1982). O aumento no tamanho do adipócito, por sua vez, está diretamente relacionado ao estoque de triacilgliceróis nestas células

(ECKEL, 1989). Este estoque de triacilgliceróis em adipócitos resulta principalmente no balanço entre a incorporação de ácidos graxos livres, liberados pela hidrólise de triacilgliceróis circulantes pela enzima lipoproteína lipase (LPL) nos capilares do tecido adiposo (TASKINEN, 1987; ECKEL, 1989; OLIVECRONA et al., 1991) e a lipólise dos triacilgliceróis estocados, estimulada pela enzima lipase sensível a hormônio (HSL), em ácidos graxos livres e glicerol (LARGE & ARNER, 1998). Estes processos regulam o tamanho do adipócito e são reciprocamente regulados, sugerindo relação inversa entre atividade da LPL do tecido adiposo e HSL (PATTEN, 1970).

A LPL está relacionada à patogênese das dislipidemias, principalmente em situações associadas à resistência à insulina (PYKALISTO et al., 1975; NIKKILÄ et al., 1977; TASKINEN, 1982). Estes dados estão de acordo com evidências de que a insulina é um dos mais potentes reguladores da LPL (SADUR et al., 1982; FARESE et al., 1991). McTernan et al., (2002) elaboraram um ensaio com adipócitos isolados de tecido adiposo de humanos normais e incubaram estas células com insulina. Nestes ensaios foi demonstrado que a exposição prolongada (47 h) destas células a altas concentrações de insulina (100 e 1.000 nmol/L) leva a aumento na expressão da LPL. Como os ratos hiperlipidêmicos de nosso modelo apresentaram hiperinsulinemia sugerimos que o aumento no peso dos panículos adiposos epididimal e perirenal seja devido ao aumento na expressão da LPL nestes tecidos com possível diminuição na ativação da HSL.

No modelo de dislipidemia desenvolvido em nosso laboratório também foi observado, nos adipócitos isolados do panículo adiposo epididimal, lipólise basal significativamente reduzida sem alteração na resposta máxima induzida pelo dibutilil-AMPc, indicando que, nestas células as etapas pós-receptor que levam à lipólise estavam intactas.

Mediadores parácrinos, tais como a adenosina, apresentam potente ação antilipolítica (CASTAN, 1994). A adenosina endogenamente liberada se liga a receptores A_1 localizados na membrana plasmática dos adipócitos e inibem a adenilato ciclase, levando a inibição tônica da lipólise (HONNOR et al., 1985a,b). A desaminação da adenosina em inosina, pela enzima adenosina deaminase, aumenta a lipólise em adipócitos (HONNOR et al., 1985a).

A lipólise basal é preferencialmente inibida pela adenosina. A insulina mesmo apresentando importante ação antilipolítica não afeta a lipólise basal, diminui sim a lipólise estimulada por agonistas que ativam a HSL como, por exemplo, as catecolaminas. Morimoto et al. (1998), estudando adipócitos isolados de ratos, demonstraram que a insulina inibe somente a lipólise induzida pelos agentes lipolíticos, tais como a noradrenalina e o hormônio adrenocorticotrófico porém não tem ação na lipólise basal que acontece na ausência de agentes lipolíticos.

Sugere-se então que a adenosina esteja envolvida na redução significativa da lipólise basal dos adipócitos isolados da região epididimal de ratos hiperlipidêmicos (WOLF-NUNES, 2004). Não foi investigado se esta inibição é decorrente do aumento na produção local de adenosina ou de aumento na expressão de receptores A_1 .

Em conjunto, estes resultados, permitem sugerir que o efeito da dieta sobre a redução da lipólise basal associada ao possível aumento da atividade da LPL no tecido adiposo, nesta região, pelas altas concentrações sanguíneas de insulina nestes ratos, contribuem para o aumento no peso deste pâncreo adiposo (WOLF-NUNES, 2004).

Estudou-se então a lipólise nestes adipócitos, sendo que os principais agentes lipolíticos são as catecolaminas e o principal hormônio antilipolítico é a insulina (LARGE & ARNER, 1998).

As ações das catecolaminas endógenas (noradrenalina e adrenalina) são mediadas pelos adrenoceptores, um grupo heterogêneo de receptores de hormônios/neurotransmissores (GARCIA- SÁINZ et al., 2000). Receptores adrenérgicos são membros da superfamília de receptores de membrana acoplados a proteína G, e existe pelo menos cinco diferentes subtipos de adrenoceptores (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3) (PIASCHIK & PEREZ, 2001).

A regulação da lipólise pelas catecolaminas envolve a estimulação da adenilato ciclase pelos subtipos β de adrenoceptores (β_1 , β_2 e β_3) e a inibição pelo adrenoceptor β_2 (LEIBEL et al., 1989; LONQVIST et al., 1993). Adipócitos isolados de ratos hiperlipidêmicos apresentaram aumento significativo na sensibilidade à isoprenalina e à adrenalina sem alteração de sensibilidade à noradrenalina, BRL37344, CGP12177A ou salbutamol. A resposta máxima foi significativamente reduzida à isoprenalina e à noradrenalina, enquanto permaneceu inalterada aos outros agonistas, quando comparado aos adipócitos provenientes de ratos controles. Estes estudos funcionais não foram conclusivos uma vez que mesmo as alterações observadas na lipólise pelos agonistas não seletivos, não foram observadas quando os adipócitos foram estimulados com agonistas seletivos individualmente, ou seja, agonista seletivo β_1 , noradrenalina, agonista seletivo β_2 , CGP12177A e salbutamol, ou agonista seletivo β_3 , BRL37344 (WOLF-NUNES, 2004). Neste modelo não foi detectada alteração na resposta dos adipócitos ao efeito antilipolítico da insulina quando o estímulo de lipólise foi a noradrenalina ($1 \mu\text{M}$).

A captação de glicose e a produção de lactato em adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos também estão sendo investigadas no modelo de dislipidemia induzida pela dieta em nosso laboratório. Dados preliminares demonstram que adipócitos isolados de ratos dislipidêmicos apresentaram produção significativamente elevada de lactato tanto basal como estimulada por agonistas adrenérgicos (Basal: controle - $0,1977 \pm 0,064$ vs dislipidêmicos - $0,3558 \pm 0,023 \mu\text{mol lactato} \cdot 10^6 \text{ céls}/60 \text{ min.}$, $p < 0,05$). A produção de lactato pelos adipócitos

induzida pela resposta máxima da noradrenalina ($1 \mu\text{M}$) foi de $0,6516 \pm 0,079 \mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$ céls/60 min. e da isoprenalina ($1 \mu\text{M}$) foi de $0,6518 \pm 0,061 \mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$ céls/60 min. A produção de adipócitos controle foi de $0,2696 \pm 0,0540 \mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$ céls/60 min para a noradrenalina e $0,2972 \pm 0,1019 \mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$ céls/60 min para a isoprenalina (CREGE, 2012).

Interessantemente, ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica sem adição de carboidratos, apresentam, além do quadro dislipidêmico, hiperlactatemia (BERNSTEIN et al., 1981; DIGIROLAMO et al., 1992), associada a subexpressão gênica de enzimas envolvidas na lipogênese e superexpressão de enzimas lipolíticas (GIRARD et al., 1994; FOUFELLE et al., 1996; LANGIN, 2006).

Os lipídios e a glicose da dieta são armazenados, principalmente, no fígado e tecido adiposo. A captação de glicose no tecido adiposo é estimulada pela insulina e catecolaminas (NONOGAKI, 2000; SMITH, 2002). O sistema nervoso simpático tem importante efeito na captação de glicose em tecido adiposo branco e marrom. *In vitro* tanto a adrenalina como a noradrenalina estimulam a captação de glicose pelos adipócitos brancos isolados de ratos controle através da ativação de adrenoceptores α_1 (LUDVIGSEN et al., 1980; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1998). *In vivo*, a infusão de noradrenalina, a longo prazo, estimula a captação de glicose em tecido adiposo branco e marrom independente da insulina, ensaios realizados em ratos (LIU et al., 1994).

Os adrenoceptores β também estão envolvidos na captação de glicose em adipócitos isolados de humanos e que ocorre um estímulo para o transporte de glicose em baixas concentrações de agonista β e uma inibição do transporte de glicose em altas concentrações (KASHIWAGI & FOLEY, 1982; LANDSBERG & YOUNG, 1992). Este fenômeno é explicado

pelo aumento na concentração do AMPc intracelular e o efeito deste segundo mensageiro como inibidor da captação de glicose (TAYLOR et al., 1976; KASHIWAGI & FOLEY, 1982).

Sabe-se que a glicose uma vez captada pelo adipócito pode ser metabolizada através da via da hexose monofosfato produzindo NADPH, essencial para a síntese de gorduras que serão armazenadas numa situação de abundância de alimento (pós-prandial) ou ser metabolizada até lactato, que uma vez na circulação, será substrato neoglicogênico para as células hepáticas em situações de jejum (DIGIROLAMO et al., 1989; CHAMPE & HARVEY, 2002).

Antigamente acreditava-se que o lactato plasmático seria fundamentalmente de origem muscular. Porém, em 1968 Doar e colaboradores demonstraram que a concentração de lactato circulante, no jejum, era maior em sujeitos obesos quando comparados a magros (DOAR et al., 1968; DOAR et al., 1970). Estes autores sugeriram que a alta concentração circulante de lactato era devida mais a uma superprodução de lactato, do que a uma subutilização, mas desconheciam a fonte deste lactato. Trabalhos posteriores relataram que doenças humanas relacionadas à resistência à insulina, tais como diabetes tipo II, estão associadas com um aumento na concentração sanguínea de lactato no jejum (BARRE et al., 1985; idem 1986) sendo este proveniente do tecido adiposo (DIGIROLAMO, 1989). A evidência de que o lactato seja produzido em pequenas quantidades pelos músculos em repouso (YKI-JARVINEM et al., 1990), sugere que o tecido adiposo desempenha papel importante na produção de precursores neoglicogênicos nesta situação.

Dessa forma, pode haver aumento na produção hepática de glicose em decorrência de maior disponibilidade do lactato, como substrato neoglicogênico, causando hiperglicemia. O aumento da glicemia estimula a secreção de insulina, podendo levar à hiperinsulinemia associada à diminuição da sensibilidade à insulina (FEDERSPIEL et al., 1980; KAHN & PESSIN, 2002). Assim, o aumento na concentração plasmática de lactato em animais submetidos a dieta

hiperlipidêmica pode ser consequência ou causa de diminuição da sensibilidade à insulina, pois há correlação positiva entre aumento da concentração de lactato e diminuição da sensibilidade à insulina (DEFRONZO, 1987; LOVEJOY et al., 1990).

De fato, a infusão de lactato por um período prolongado, causa resistência à insulina em tecido muscular (VETTOR et al., 1997). Choi e colaboradores (2002) demonstraram que, em cães conscientes, a elevação plasmática de lactato suprimiu a glicólise estimulada pela insulina, antes que ocorresse diminuição da captação de glicose. Estes autores preconizam que uma deficiência metabólica precede e causa resistência à insulina em músculo esquelético, sugerindo que o lactato pode induzir resistência à insulina pela supressão do fluxo glicolítico. Em 1980, Pearce & Connet observaram, em músculo sóleo isolado e incubado com 8 mM de lactato, diminuição da oxidação da glicose estimulada pela insulina. Clark e colaboradores (1987) verificaram a mesma resposta em músculos epitrocleares, notificando relação inversa entre a taxa de glicólise e o aumento da oxidação de lactato. A diminuição da glicólise pelo lactato parece envolver inibição das enzimas 6-fosfofrutoquinase (PFK-1) e piruvato desidrogenase (PDH), limitantes da glicólise. Este efeito é similar ao efeito desencadeado pelos ácidos graxos (KIM et al., 1996). Em músculo cardíaco, o lactato promove aumento da concentração de citrato (inibidor da PFK-1), diminuição da concentração de frutose-2,6-bifosfato (estimulador da PFK-1) e aumento da relação NADH/NAD, podendo inibir a PDH (DEPRE et al., 1993; idem 1998). Ristow et al. (1997; 1999) demonstraram que deficiência da PFK-1 determina resistência à insulina, fortalecendo a hipótese de Choi e colaboradores (2002). Faintrenie & Géloen em 1996 demonstraram em adipócitos isolados de ratos, aumento na produção de lactato após a estimulação por agonista α -adrenérgico e posteriormente foi demonstrado que o subtipo envolvido era o α_{1b} (GRASSI-KASSISSE & GÉLOËN, 2000).

De acordo com todos os dados apresentados, sugere-se, portanto, que provavelmente o lactato vindo dos adipócitos através do aumento da captação de glicose estimulada pelos adrenoreceptores α_1 estaria sendo uma fonte essencial para a neoglicogênese hepática, o que estaria contribuindo para a hiperglicemia e conseqüentemente a hiperinsulinemia apresentada pelos animais tratados com dieta hiperlipídica.

O estudo sobre os efeitos da dieta hipercalórica, hiperlipídica, sobre a lipólise em adipócitos de ratos sedentários tem sido extremamente relevante uma vez que, a incidência de síndrome plurimetabólica vem aumentando a cada dia devido às condições sedentárias de um padrão de vida ocidental. Diante dos resultados, o presente trabalho buscou ampliar os conhecimentos relacionados ao modelo indução da dislipidemia pela dieta em ratos quantificando a expressão gênica de enzimas acetil-CoA carboxilase alpha (Acaca), lipoproteína lipase (LPL), lipase hormônio-sensível (HSL), gliceroquinase (GyK), glicose-6-fosfatase (G6PC), 6-fosfofrutoquinase (PFK-1), piruvato desidrogenase quinase 4 (PDK4) e piruvato desidrogenase fosfatase 2 (PDP2), envolvidas nos processos de lipogênese, lipólise e neoglicogênese, dos adipócitos e hepatócitos isolados de animais normo e hiperlipidêmicos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos moleculares envolvidos no quadro apresentado por ratos hiperlipidêmicos, buscando assim melhor compreender as alterações fisiológicas induzidas pela dieta hiperlipídica administrada ao longo de 4 semanas e pelo sedentarismo e assim reforçar a importância do modelo para desenvolvimento de estratégias de estudos de prevenção e tratamento de doenças tais como, a Diabetes Mellitus tipo 2, hipertensão e aterosclerose, que apresentam uma incidência extremamente elevada na população mundial, colaborando assim para o esclarecimento desta pandemia que acomete a população que é a síndrome metabólica decorrente da dieta hiperlipídica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar a expressão gênica de enzimas chaves envolvidas nos processos de lipólise (lipase hormônio-sensível – HSL), lipogênese (acetil-CoA carboxilase alpha - Acaca, lipoproteína lipase - LPL, gliceroquinase - GyK), gliconeogênese (glicose-6-fosfatase - G6PC) e glicólise (6-fosfofrutoquinase - PFK-1, piruvato desidrogenase quinase 4 - PDK4 e piruvato desidrogenase fosfatase 2 - PDP2) nos adipócitos e hepatócitos isolados de animais normo e hiperlipidêmicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, Albina, Rodentia, Mammalia), que chegaram ao biotério com três semanas e peso aproximado de 60 g permanecendo em adaptação por três semanas. Após este período, os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (três animais por gaiola) por 4 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. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia (CEEA 1915-1).

Grupos e dieta: Os ratos do grupo controle, (normolipidêmicos; C, n= 6), foram alimentados com uma ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil (<http://sogorb.com.br/01-08-01.html>). Outros animais foram alimentados com ração hiperlipídica, (hiperlipidêmicos; H, n = 6), contendo 15% de gordura de manteiga de cacau, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico; HN&C Consultoria em Nutrição Experimental, Brasil (CNPJ = 10.427.871/0001-40), durante 4 semanas (WOLF-NUNES *et al.*, 2000; MIOTTO, 2001; WOLF-NUNES, 2004). A ração e a água foram oferecidas diariamente *ad libitum* no período de adaptação ao biotério, entretanto nas semanas de quantificação do consumo (4 semanas) foi oferecido 500 g de ração/gaiola.

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 et al., 1993). Densidade calórica = 5,36 cal/g.

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

Controle da evolução ponderal e consumo de ração: Durante as 4 semanas em que os ratos permaneceram no biotério sendo alimentados com dieta hiperlipídica ou não, foram avaliados o peso corporal e o consumo de ração. Este controle foi realizado 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras), sempre no período entre 09 e 11 horas.

Sacrifício dos ratos e coleta de tecidos e sangue: Toda metodologia utilizada para coleta de sangue e tecidos seguiu aquela descrita por Hatore, 2006. Resumidamente procedemos da seguinte forma:

Ao final das 4 semanas de ingestão da dieta, os ratos foram colocados em regime de jejum de 16 h. No dia seguinte os ratos foram anestesiados com Tiopental 60 mg/Kg e o sangue foi coletado por punção cardíaca, em seringa heparinizada, e o plasma utilizado para análise de glicemia, colesterol e triacilglicerol sendo esta realizada por meio de fitas de dosagem Accutrend no aparelho Accutrend Plus.

Após a coleta de sangue, os tecidos adiposo e hepático foram retirados e imediatamente colocados em tubos de 2 mL contendo solução de Trizol (*Invitrogen, Life Technologies*) sendo então politronados, congelados em nitrogênio líquido e estocados em biofreezer (-80°C) para posterior extração de mRNA. Foram coletadas amostras do lóbulo hepático superior e panículos adiposos das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal para análise histológica conforme Wolf-Nunes, 2004 e descritas abaixo.

Parâmetros morfológicos:

Tecido Hepático:

A análise seguiu os procedimentos utilizados por Wolf-Nunes, 2004. Resumidamente o fígado foi isolado e pesado. Uma amostra do lobo superior foi isolada e colocada em solução formol-salina (200 mL de água destilada; 50 mL de formaldeído 40% e 250 mL de tampão fosfato, 0,2 M pH 7,4) durante 24 h. As amostras em seguida foram lavadas com álcool 70% e armazenadas nesta solução até o dia da inclusão em parafina.

Para inclusão procedeu-se a desidratação em série crescente de solução de álcool etílico até o álcool absoluto, a clarificação em xilol (álcool-xilol 1:1 e xilol puro) e a impregnação em xilol-parafina (1:1) finalmente foi realizada a inclusão e emblocagem a 58°C, em “Paraplast plus” (mistura de parafina, polímeros plásticos e dimetilsulfóxido). Os cortes hepáticos devidamente incluídos foram colados em blocos de madeira e cortados em espessura de 5 mm ou cortes de 2 mm em micrótomo “820” Spencer (American Optical Corporation, USA). Cerca de 3 cortes foram colocados em cada lâmina. Após desparafinização com xilol e hidratação os cortes foram corados com hematoxilina/eosina ou Sudan black-B. As imagens foram visualizadas em microscópio Leica-RM 2145 (Leica® microsystem Nussloch, Alemanha) e as imagens

capturadas em computador usando o software IMAGE PRO PLUS ANALYSER com a ampliação de 100 x.

Ensaio com Tecido Adiposo e Adipócitos isolados de tecido adiposo peri-renal, mesentérico e epididimal:

Morfometria adipocitária: Os procedimentos de isolamento de adipócitos e de morfometria foram realizados segundo Pinheiro et al., 2007 e descritos a seguir.

Adipócitos foram isolados do tecido adiposo epididimal, mesentérico e peri-renal por modificação no procedimento original de RODBELL (1964). O tecido adiposo foi pesado, picado e digerido em tubo falcon (50 mL) estéril contendo solução de KRBA (KREBS-RINGER BICARBONATO ALBUMINA). A preparação desta solução envolveu duas etapas. A primeira delas foi a preparação de 200 mL do tampão KREBS-RINGER constituído por 200 mL de NaCl (0,154 M), 8 mL de KCl (0,154 M), 6 mL de CaCl₂.2H₂O (0,110 M), 2 mL de KH₂PO₄ (0,154 M), 2 mL de MgSO₄.7H₂O (0,154 M). Em seguida, foi feita uma mistura deste tampão KR com NaHCO₃, na proporção de 91% de KR e 9% de NaHCO₃, portanto, para se fazer 200 mL utilizamos 182 mL de KR e 18 mL de NaHCO₃. Para completar o tampão foi adicionado glicose e Hepes. Para o volume de 200 mL, adicionamos 0,476 g de Hepes e 0,216 g de glicose, obtendo no tampão, a concentração de 25 mM para o Hepes e 6 mM de glicose.

Para realização da digestão do tecido adiposo e do ensaio funcional com os adipócitos isolados, foi preparado 200 mL de um novo tampão KR-HEPES, porém com adição de 6 g de albumina sérica bovina (BSA, fração V, livre de ácidos graxos). Para cada 100 mL de KR-HEPES adiciona-se 3 g de albumina. Esse novo tampão recebe o nome de KRBA (KREBS-RINGER BICARBONATO ALBUMINA). O tubo foi agitado em 60 ciclos/min a 37°C durante 45 minutos. A suspensão celular resultante foi filtrada através de uma malha de nylon (200 mm) e

lavada três vezes com tampão fresco KRBA. O infranadante resultante de cada lavagem foi separado num frasco de polietileno contendo 6 mL de KRBA fresco (FARIAS-SILVA et al., 1999; FARIAS-SILVA et al., 2002; FARIAS-SILVA et al., 2004;). Uma alíquota da suspensão celular final foi contada em câmara Mallassez para registro fotográfico e posterior medição utilizando o software IMAGE PRO PLUS ANALYSER após captura de imagem através do microscópio Leica (área analisada de 632 mm).

Extração de RNA: foi feita extração de RNA total das amostras de tecido adiposo epididimal, mesentérico e peri-renal, segundo método do reagente Trizol (Invitrogen Corporation, CA, USA). Estas amostras, após extração, foram analisadas em gel de eletroforese (Figura 1) e no Nanodrop cedido pelo Hemocentro para verificação da integridade das amostras (Tabela 2). Constatada a integridade do RNA, utilizamos o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), para a produção do cDNA, sendo a concentração final do cDNA de 3,0 µg. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene, sendo esta eficiência verificada segundo método descrito abaixo.

PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR): as reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para os genes HSL, LPL, Acaca, GyK, G6PC, PFK1, PDK4 e PDP2 utilizamos respectivamente os seguintes ensaios (TaqMan™ - Applied Biosystems) Rn 00563444_m1, Rn 00561482_m1, Rn 00573474_m1, Rn 00577740_m1, Rn 00566132_m1, Rn 00585577_m1 e Rn 02061644_s1. O gene GAPD Rat (TaqMan™ - Applied Biosystems), Part number 4352338E, foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes

amostras. A sonda GAPD está marcada com o fluoróforo VIC, enquanto os primers para os alvos estão marcados com o fluoróforo FAM.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizamos a validação do sistema gene alvo, no caso, HSL, LPL, Acaca, GyK, G6PC, PFK1, PDK4 e PDP2 com o controle endógeno GAPD Rat. Verificamos que as eficiências de amplificação dos genes foram próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse.

Validação da eficiência dos genes de interesse: a validação consistiu na amplificação, tanto com os primers dos genes de interesse quanto com o do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de concentrações diferentes (diluições seriadas) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct [Threshold Cycle: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (Threshold), o qual é definido arbitrariamente]. Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (slope) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do sistema foi calculada através da fórmula: $E = 10(-1/\text{slope}) - 1$. Para a placa de validação dos genes, foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA de tecidos adiposo de rato em 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 5x).

Após o cálculo das eficiências de amplificação de cada gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores,

a qual possui uma equação de reta na qual é possível verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

A concentração de amostra validada como eficiente para os genes *Acaca*, *LPL*, *G6PC*, *GK*, *PDK4*, *PFK1* e *GAPDH* em tecido hepático foi de 30,0 ng de cDNA, enquanto que para os tecidos adiposos essa concentração foi de 40,0 ng de cDNA para os genes *HSL*, *LPL*, *Acaca*, *PDK4*, *PDP2* e *GAPDH*.

Para a quantificação relativa dos genes em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 5 μ L de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 2x, 0,5 μ L da solução de primers e sonda, 0,5 μ L de água e 4,0 μ L de cDNA, sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 μ L de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A expressão gênica foi avaliada em tecidos de animais tratados com dieta hiperlipídica e animais controle tratados com dieta padrão. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). No programa Prisma GraphPad 5.0 foi realizado teste *t* de Student para verificar se havia diferença significativa na expressão do gene de interesse.

Análise Estatística dos Resultados: todos os resultados foram expressos como médias \pm EPM de experimentos realizados. Os valores foram analisados utilizando-se de teste *t* de Student, para comparar dois grupos experimentais, e ANOVA seguida do teste de Tukey, quando

comparamos mais de dois grupos experimentais, usando Prisma Software e com valor de $p < 0,05$ indicativo de significância. Em algumas análises, foram realizados ambos os testes dentre os quais foi citado nos rodapés das tabelas apenas o teste com diferença significativa ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do modelo de dislipidemia em ratos

4.1.1 *Ganho de peso e consumo alimentar e calórico*

Com o objetivo de avaliarmos se as condições experimentais utilizadas mantinham os resultados obtidos anteriormente do modelo de dislipidemia em ratos induzida pela dieta (WOLF-NUNES et al., 2000; WOLF-NUNES, 2004; MIOTTO, 2006; SCHWEIGER et al., 2006) acompanhamos a evolução ponderal dos ratos e quantificamos o consumo diário de ração.

Na figura 1 observa-se que os ratos que consumiram dieta hiperlipídica ganharam peso de maneira similar aos ratos controle. Estes dados confirmam os obtidos anteriormente por Wolf-Nunes, 2004 e Miotto, 2006. Interessante observar que mesmo apresentando o mesmo ganho de peso os ratos que consumiram a dieta hiperlipídica ingeriram quantidade significativamente menor deste alimento (C: $20,8 \pm 0,62$ g vs D: $14,87 \pm 0,66$ g, $p < 0,05$). Estes resultados também corroboram com Wolf-Nunes, 2004, que identificou consumo significativamente menor de ração em ratos cuja dieta hiperlipídica foi oferecida como única fonte de alimento. Além disto, também em Wolf-Nunes, 2004, foi avaliada a quantidade calórica desta ração e foi observado que a dieta hiperlipídica contém 5 Kcal/g enquanto que a dieta padrão apresenta 4 Kcal/g. Desta forma os ratos que consumiram dieta hiperlipídica neste presente estudo também apresentaram um consumo calórico significativamente menor que os ratos que ingeriram dieta padrão (média de consumo calórico C: $83,33 \pm 2,48$ Kcal vs D: $74,34 \pm 3,35$ Kcal, $p < 0,05$).

O ganho de peso de ratos jovens que ingeriram dieta hiperlipídica foi semelhante ao dos ratos que ingeriram dieta padrão apesar da ingesta alimentar e calórica ter sido significativamente menor dos ratos que ingeriram dieta hiperlipídica. A ingestão alimentar fornece ao organismo o aporte calórico necessário, juntamente com micronutrientes (vitaminas e sais minerais) e

macronutrientes (carboidratos, gorduras e proteínas), para realizar as funções orgânicas. O comportamento alimentar trata-se de um comportamento complexo com vários centros de controle (HALFORD & BLUNDELL, 2000; SCHWARTZ et al., 2000). Nossos resultados estão de acordo com trabalhos clássicos da literatura demonstrando diminuição na ingesta alimentar quando lipídios são administrados intraduodenalmente (NOVIN et al., 1979; REIDELBERGER et al., 1983; GREENBERG et al., 1990; CARLSON, 2002). Os autores sugerem que existem receptores de nutrientes no duodeno que enviam para o cérebro sinais nervosos que desencadeiam a sensação de saciedade e que este efeito acontece ainda no período pré-absortivo (GREENBERG et al., 1990).

Além disto, um grande número de neuropeptídeos está envolvido no controle que o sistema nervoso central exerce sobre a ingesta alimentar e o balanço energético, tais como neuropeptídeo Y, hormônio liberador de corticotropina, somatostatina entre outros. Entretanto, a leptina, hormônio sintetizado e secretado pelos adipócitos e relacionado à quantidade de lipídio estocado, participa ativamente no sistema de controle de ingesta (FRIEDMAN et al., 1985; PELLEYMOUNTER et al., 1995; MAFFEI et al., 1995; FRIEDMAN & HALAAS, 1998; AINSLIE et al., 2000). Os ratos que ingeriram dieta hiperlipídica por seis semanas não apresentaram alterações na concentração circulante de leptina mesmo tendo apresentado aumento significativo no peso dos panículos adiposos das regiões epididimal e peri-renal (WOLF-NUNES, 2004). Estes dados estão de acordo com Haluzík et al. (2000), que, em estudos em humanos, demonstraram não existir diferença entre as concentrações séricas de leptina em indivíduos hiperlipidêmicos não obesos.

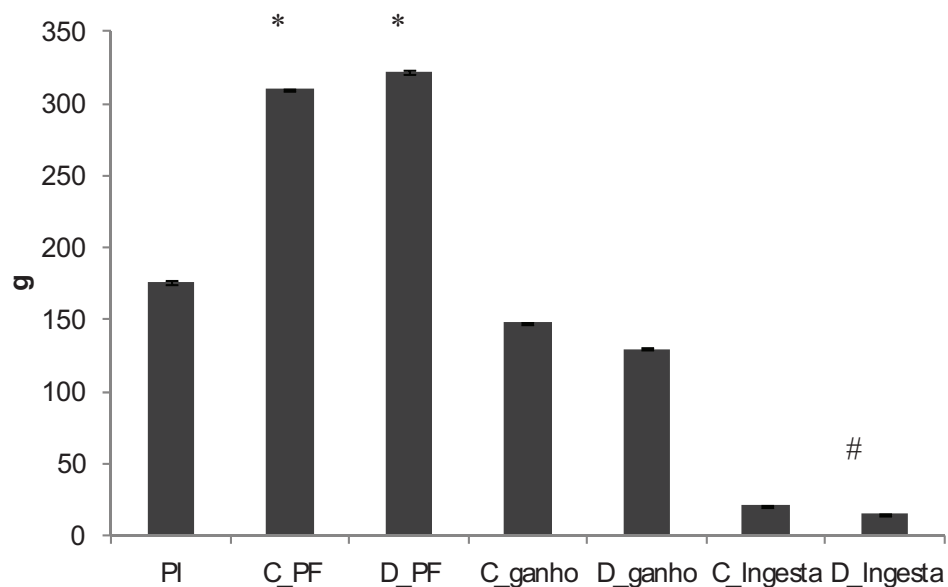


Figura 1: Análise da ingesta alimentar e ganho de peso de ratos controle (C) e tratados com dieta hiperlipídica (D). A dieta foi oferecida *ad libitum* ao longo de 4 semanas aos ratos que permaneceram em gaiolas coletivas (3 ratos por gaiola). O peso, em gramas (g), dos ratos foi quantificado diariamente e o consumo de ração três vezes por semana. PI: peso inicial. C_PF: Peso Final dos ratos Controle. D_PF: Peso Final dos ratos Dieta. C_Ganho: ganho de peso dos ratos Controle. D_Ganho: ganho de peso dos ratos Dieta. C_Ingesta: Média diária de ingesta de ração dos ratos Controle. D_Ingesta: Média diária de ingesta de ração dos ratos Dieta. * $p < 0,05$ em relação ao PI; # $p < 0,001$ Ingesta diária dos ratos Controle vs ingesta diária dos ratos Dieta. $n=5$.

4.1.2 Análises plasmáticas

Analisamos as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triacilgliceróis que estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações plasmáticas de ratos controle e submetidos a dieta hiperlipídica por 4 semanas. As análises foram realizadas com auxílio de fitas dosadoras e submetidas à leitura em aparelho da Accutrend® (Roche Diagnostics D-68298, Mannheim, Germany). O sangue foi coletado por punção cardíaca em ratos após jejum de 16 h, com seringa heparinizada e sob anestesia.

	Controle (n=7)	Dieta (n=8)
Glicose, mg/dL	125,28±12,50	117,56±19,03
Triacilglicerol, mg/dL	90,28±3,27	122,25±8,74
Colesterol Total, mg/dL	153,16±0,96	156,85±1,39

Os dados demonstram não haver alteração significativa nos valores de glicemia, embora estes valores estejam acima da concentração glicêmica de jejum 99 mg/dL, assim como foi observado por Wolf-Nunes, 2004 (4 semanas: JNA:96,4±5,8 mg/dL, n=5; JHA: 100,6±5,0 mg/dL, n=5 e com 6 semanas: JNA: 104,2±4,8 mg/dL; JHA: 99,6±5,1) e Miotto, 2006 (6 semanas: Normolipidêmico 112,9±11,9 mg/dL; Hiperlipidêmico: 110,5±4,9 mg/dL).

As concentrações plasmáticas de triacilgliceróis dos ratos que ingeriram dieta foi 35% acima dos valores obtidos de ratos controle embora sem diferença significativa. Wolf-Nunes, 2004 estudando também a administração da dieta por quatro e seis semanas em ratos jovens e

adultos, obtiveram valores para triacilgliceróis de ratos dieta 41% acima dos valores de ratos controle e neste caso foram estatisticamente diferentes (C=31,8±1,8 mg/dL vs D=44,0±2,8 mg/dL) e Miotto em 2006 confirmou este aumento (51%) com administração de dieta por seis semanas (N=20,9±1,2 mg/dL vs D=51,3±1,7 mg/dL; n=4 e 5 respectivamente).

Em relação a concentração de colesterol total os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com Wolf-Nunes, 2004, que descreve não haver alteração significativa na quarta semana de administração de dieta. Já para Miotto (2006) que administrou a dieta por seis semanas, obteve valores significativamente mais elevados de colesterol total.

O aumento da concentração de triglicerídeos nos animais tratados com dieta nos indica o início do desenvolvimento de um quadro de dislipidemia. Miotto 2006, administrou a dieta por 6 semanas e determinou elevada concentração plasmática de triglicerídeos, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Entretanto, a concentração da fração lipoprotéica HDL (alta densidade) não se alterou com a dieta enquanto ácidos graxos livres também não apresentaram diferença estatisticamente significativa. A presença desta dislipidemia decorrente da dieta pode ter um papel mais importante na indução de outras alterações metabólicas do que se tem proposto.

Por outro lado, a resistência à insulina e o diabetes são apontados como os principais indutores de diversas doenças metabólicas. A insulina apresenta efeito inibitório na liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo e efeito estimulatório no catabolismo das micelas e da fração VLDL, além de favorecer o *clearance* da fração LDL (DEFRONZO & FERRANNINI, 1991; MALMINIEMI et al., 1995). Contudo, no estado de resistência à insulina estas ações se apresentam reduzidas e, conseqüentemente, a concentração destes lipídios no sangue se eleva, pois ocorre uma aceleração na síntese de VLDL, enquanto a fração HDL se apresenta inalterada ou mesmo reduzida, o que resulta em hipertrigliceridemia e esteatose hepática (KUSUNOKI et

al., 2002), como também foi observado por Wolf-Nunes, 2004 e nos ratos aqui estudados.

Em um estudo feito com humanos em 1998, Bonora et al. constataram que a hipertrigliceridemia e a diminuição da HDL nunca ocorriam como desordens isoladas, e sim como uma síndrome plurimetabólica. Logo, no conjunto, os resultados observados neste modelo de indução de dislipidemia podem indicar a instalação de uma síndrome, conhecida como Síndrome X ou Síndrome Plurimetabólica, a qual é caracterizada por um conjunto de diversas doenças.

A estreita relação entre esta síndrome e resistência à insulina sugere ser este último um dos principais fatores conduzindo à síndrome (DEFRONZO & FERRANNINI, 1991; HAFFNER & MIETTINEN, 1997), visto que resistência à insulina, associada à hiperinsulinemia, tem sido associada ao desenvolvimento de doenças como dislipidemia, aterosclerose e hipertensão (REAVEN, 1988, DEFRONZO & FERRANNINI, 1991; OSEI, 1999; RAJI et al., 2000). Entretanto, apesar desta corrente indicando ser a resistência à insulina o fator causador, a fonte geradora desta síndrome ainda não é conhecida ou comprovada, devido à sua complexidade, o que conduz à seguinte questão: qual desordem realmente dá início à Síndrome X?

Miotto 2006, utilizou uma dieta rica em gordura durante 6 semanas para desenvolver hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia em ratos. Contudo, os resultados mostraram aumento paralelo da glicemia juntamente com uma hiperinsulinemia, leve hipertensão arterial e hipertrofia ventricular cardíaca no período relativamente curto da administração da dieta hiperlipídica, sugerindo que um desequilíbrio lipídico poderia ser o fator desencadeante de todo o processo que conduzirá a uma resistência à insulina e, possivelmente, a longo prazo, à Síndrome X.

Por exemplo, Pan et al. (1997) propuseram que o acúmulo intracelular de triglicérido poderia aumentar a produção de glicose e, conseqüentemente, interferir com a ação da insulina, de forma a reduzir a ação da insulina na musculatura (BODEN, 1996; BERGMAN & ADER,

2000).

Já em 1978, Bernstein et al. sugeriam um mecanismo patogênico para o desenvolvimento de hipertrigliceridemia, onde um estado de resistência à captação de glicose conduziria à hiperinsulinemia que, por sua vez, aumentaria a produção de lipoproteínas de muito baixa densidade rica em triglicerídeos (VLDL-TG), aumentando assim a concentração plasmática de triglicerídeos. Como já citado por Danev et al. (1997), a concentração aumentada de lipídeos plasmáticos correlaciona-se significativamente com um tônus simpático cronicamente aumentado, pois o sistema nervoso simpático é responsivo à ingestão alimentar (KAUFMAN et al., 1991) e recentes evidências experimentais indicam que sua atividade pode ser alterada pela dieta ou, mais especificamente, pela alta concentração de macronutrientes como carboidratos e lipídios na corrente sanguínea, de forma que situações de jejum tendem a suprimi-la, enquanto dietas ricas nestes macronutrientes tendem a aumentá-la (CRANDALL et al., 1983; DEFRONZO & FERRANNINI, 1991; KAUFMAN et al., 1991).

Vários dados na literatura apontam o fato de que a ingestão de uma dieta hiperlipídica afeta outros parâmetros fisiológicos, como indução da ativação do eixo sistema nervoso simpático-medula adrenal e também do eixo hipotálamo-hipófise-córtex adrenal causando, respectivamente, a elevação das concentrações plasmáticas de catecolaminas e de glicocorticóides. Catecolaminas que atuam como neurotransmissores poderiam causar elevação adicional nas concentrações de glicocorticóides, através de adrenoceptores localizados no hipotálamo, os quais estimulam a liberação de hormônio liberador da corticotrofina (CRH). Este último causa elevação nas concentrações plasmáticas não apenas de corticotrofina (ACTH) (NOMURA et al., 1981; AL-DAMLUJI, 1988), como também das próprias catecolaminas (BROWN & FISHER, 1984; 1985), as quais, em conjunto, promovem alterações metabólicas no sentido de causar mobilização de substratos energéticos a partir dos tecidos de armazenamento, como o hepático e o adiposo

branco, liberando-os para a circulação sanguínea (BERNE & LEVY, 2000). Isto afetaria significativamente o metabolismo de carboidratos, pois as catecolaminas endógenas, principalmente a adrenalina, estimulam a glicogenólise e a gliconeogênese hepáticas (HIMMS-HAGEN, 1967; EXTON et al., 1972; HUE et al., 1978; YOREK et al., 1980; KNEER & LARDY, 1983; PILKIS et al., 1988; WATT et al., 2001). Em tecido pancreático estas, através de adrenoceptores α , estimulam a liberação de glucagon pelas células α das ilhotas de Langerhans, enquanto inibem a liberação de insulina pelas células β (PORTE JR., 1969; POERTE JR. & ROBERTSON, 1973), sendo que os adrenoceptores β podem estimular a liberação de insulina pelas células β -pancreáticas (YOSHIDA, 1992; ATEF et al., 1996). A corticosterona por sua vez influencia o metabolismo de carboidratos por meio de sua ação permissiva aos efeitos glicogenolíticos e gliconeogênicos das catecolaminas e do glucagon (EXTON et al., 1972). Como resultado destes efeitos ocorre aumento da glicemia (VERAGO et al., 2001; RETANA-MARQUEZ et al., 2003).

Se considerarmos a possibilidade de que nos ratos hiperlipidêmicos ocorra uma hiperatividade simpática esta condição poderia resultar em um significativo aumento da glicemia de jejum, como verificado nos ensaios do *iv*GTT e do *clamp* por Miotto, 2006, quando analisada a glicemia pelo glicosímetro, ou seja ratos acordados e glicemia analisada no sangue total. Entretanto, quando amostras sanguíneas de ratos hiperlipidêmicos foram analisadas com o *kit* enzimático, e em ratos anestesiados não identificamos a diferença. Além disso, fatores que conduzem a esta glicemia de jejum elevada, como uma captação reduzida da glicose, foram verificados em testes como o de tolerância à glicose, mas nenhuma diferença estatística foi observada.

Srinivasan et al. (2005), utilizaram o ensaio de *iv*GTT para determinar a sensibilidade à insulina e verificaram redução significativa da taxa de remoção de glicose. Entretanto, estes

autores utilizaram uma porcentagem de gordura na dieta administrada aos animais muito superior à utilizada em nosso modelo (58% vs 25).

Os valores médios da taxa de infusão de glicose no *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico realizado por Miotto, 2006, demonstraram valores significativamente mais elevados para o grupo hiperlipidêmico, o que não está de acordo com dados de literatura onde se observa resistência à insulina (KUSUNOKI et al., 2002). Este resultado indica, por outro lado, que os ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentam maior captação da glicose sanguínea, com significância estatística observada na segunda hora do ensaio. O que diferencia o ensaio de Miotto dos outros da literatura é que foi realizado com os ratos acordados, isto pode influenciar a captação de glicose quando comparada aos ratos anestesiados. Wolf-Nunes (2004) verificou que, mesmo os ratos apresentando hiperinsulinemia após 6 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, os adipócitos isolados da região epididimal de ratos do grupo dieta não apresentava alteração na resposta antilipolítica da insulina.

Farias-Silva et al. (2002) verificaram, em estudos de indução de estresse em ratos por choque nas patas, que estes animais apresentavam hiperglicemia e hiperinsulinemia após três sessões de choque. Por outro lado, verificaram também que a secreção estática de insulina pelas ilhotas pancreáticas estimulada pela glicose não estava alterada pelo choque. Neste modelo foram quantificadas as concentrações de corticosterona as quais estavam significativamente mais elevadas em ratos do grupo choque (VERAGO et al., 2001).

Glicocorticóides e catecolaminas inibem a captação de glicose por tecidos periféricos, desta forma conservando-a para eritrócitos e células nervosas. Assim, a elevada concentração plasmática de glicose resistente à hiperinsulinemia observada por Miotto, 2006, como aquela observada em ratos submetidos a estresse, pode ser consequência da alta concentração destes hormônios do estresse, ao invés de resistência à insulina. Além disso, neste caso, poderíamos

pensar que a dieta hiperlipídica administrada aos animais seria uma fonte de estresse, conduzindo a efeitos semelhantes àqueles verificados pelo choque nas patas.

Assim, com os resultados obtidos até 2006, havia a indicação de que os ratos submetidos a dieta hiperlipídica ao longo de seis semanas não estavam resistentes à insulina e, aparentemente, apresentam sensibilidade maior ao seu efeito de promover a captação de glicose, quando avaliados por *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico e sem anestesia. O fato destes ratos não apresentarem um estado de resistência à insulina parece demonstrar uma condição prévia a todos os sintomas da síndrome metabólica que se pretendeu induzir neste modelo animal. As variações na administração da dieta novamente devem ser consideradas, pois diferenças da porcentagem de lipídios utilizados nos vários estudos e a questão do prazo durante o qual a dieta foi administrada nos remete à seguinte questão: Qual seria o tempo de hiperinsulinemia para que a resistência a insulina se instale?

Resistência à insulina pode promover diminuição do conteúdo de glicogênio no músculo esquelético (KUSUNOKI et al., 2002). Sob condições experimentais de euglicemia e hiperinsulinemia, como no ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, o metabolismo não-oxidativo da glicose refletiria primariamente a síntese de glicogênio no músculo esquelético, com apenas pequena quantidade de glicose sendo convertida em lipídios e/ou lactato. Um estado de resistência à insulina poderia promover uma diminuição do metabolismo não-oxidativo da glicose estimulado pela insulina e, desta forma, uma menor estocagem de glicose no músculo na forma de glicogênio seria verificada (VESTERGAARD et al., 1995).

Outro resultado que sugere a não resistência à insulina nos ratos que ingeriram dieta por seis semanas é que o conteúdo de glicogênio avaliado nos músculos ventricular e gastrocnêmico porção vermelha não estavam alterados enquanto que o músculo gastrocnêmico porção branca estava significativamente elevada. (MIOTTO, 2006). Este efeito pode ser decorrente da maior

adaptação deste tipo de músculo, de fibras glicolíticas, a determinadas situações onde uma maior reserva energética se faz necessária, como ocorre em condições de estresse crônico. Entretanto, há de se considerar as informações da literatura quanto a ativação do sistema nervoso simpático em modelos de dislipidemias. Esta informação nos remete a sugestão de que a captação periférica de glicose pode estar sendo compensada pela ação do simpático.

Resistência à insulina pode promover diminuição na atividade da glicogênio sintetase, o que resulta em redução na síntese de glicogênio (KUSUNOKI et al., 2002). No entanto, como relatado por Upton et al. (1998) que verificaram que a síntese de glicogênio no fígado não era afetada em ratos diabéticos Zucker, este efeito nem sempre foi confirmado. Além disso, Kusunoki et al. (2002) também estudaram ratos alimentados por 10 semanas com dieta rica em lipídeos, mas contendo 26,7% de óleo de girassol, e afirmaram haver uma relação inversa entre o conteúdo de glicogênio e de triglicerídeo hepático. Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório com este modelo animal já confirmaram a condição de esteatose hepática nestes animais (WOLF-NUNES, 2004; MIOTTO, 2006). No entanto, pelos dados obtidos até 2006 sugerimos que o quadro de resistência à insulina não está instalado nestes animais e, apesar da condição de esteatose hepática observada neste modelo, podemos verificar que o conteúdo de glicogênio hepático não foi alterado entre os grupos estudados, apenas são depletados pelo jejum a que os animais foram submetidos. Logo, como seria mantida esta glicemia de jejum elevada nos ratos alimentados com dieta hiperlipídica?

Uma possibilidade relaciona-se com a hipótese de Randle et al. (1963), onde a elevada concentração de ácidos graxos livres decorrente da dieta e, conseqüentemente, o aumento de sua disponibilidade, os torna mais utilizados para processos metabólicos oxidativos, reduzindo a captação de glicose e sua utilização no tecido muscular esquelético e no tecido adiposo. Isto poderia, ainda, ocasionar o acúmulo intramuscular de triglicerídeos e o aumento da produção de

glicose, o que precederia as ações periféricas da insulina (BODEN, 1996; PAN et al., 1997; BERGMAN, 2000).

Além disso, produtos derivados do tecido adiposo, como leptina, PPAR γ , TNF α apresentam ações fundamentais na regulação do armazenamento dos substratos energéticos e na sua homeostasia. O aumento de PPAR γ pode contribuir, por exemplo, para aumentar a expressão de genes envolvidos no transporte e na oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético, podendo até ocasionar o acúmulo de lipídios no músculo, reduzindo sua capacidade oxidativa em sujeitos obesos e diabéticos e afetar o metabolismo glicêmico (KAWAMURA et al., 2004).

Outra possibilidade envolve a produção de lactato: animais alimentados com dieta rica em gordura apresentam aumento da taxa de conversão de glicose para lactato, o qual seria reconvertido a glicose no fígado pelo ciclo de Cori. Este efeito da dieta seria rápido (em torno de duas semanas) e estaria acompanhado por um estado de resistência específica em certos tecidos ou mesmo sistêmica à insulina (DIGIROLAMO et al., 1992). Entretanto, antes do quadro de resistência à insulina se fixar, poderia ser observada uma elevação da glicemia e, em resposta, uma hiperinsulinemia.

Sabe-se que o excesso de algum dos itens na suplementação alimentar, principalmente com relação à glicose e à gordura, pode causar resistência à insulina nos tecidos muscular e adiposo, bem como prejudicar a supressão da produção endógena de glicose. Modelos experimentais alimentados com dietas ricas em gordura mostraram redução na tolerância à glicose, associada a um menor metabolismo basal da glicose e/ou mediado pela insulina (PROIETTO et al., 1999).

A diminuição na afinidade da insulina a seu receptor e/ou do transporte de glicose são constantemente relacionados a alterações da composição de ácidos graxos da membrana celular, são decorrentes de dieta hiperlipídica e rica em gordura saturada, como a que constitui a dieta utilizada neste experimento. Esta é considerada mais deletéria com relação à resistência à insulina

induzida por gordura, quando comparada a dietas mono e poliinsaturada (LICHTENSTEIN & SCHWAB, 2000). Além disso, o consumo excessivo de calorias e consequente ganho de peso também conduzem ao quadro de resistência dos tecidos à ação da insulina.

No entanto, as células pancreáticas são capazes de aumentar sua atividade secretora quando a eficácia na ação deste hormônio diminui. O resultado é um estado metabólico bem compensado, onde a resistência à insulina é compensada pelo aumento de sua secreção causando hiperinsulinemia. Com a continuidade deste estado de resistência à insulina, a excessiva taxa de secreção de insulina não pode ser mantida e o indivíduo torna-se diabético, além de estar sujeito às demais disfunções descritas acima (DEFRONZO & FERRANNINI, 1991). Assim, podemos questionar: em que estágio se encontram os animais deste estudo? Uma vez que apresentam aumento significativo na glicemia de jejum, quando submetidos a dieta por seis semanas, mas não apresentam alterações no teste de tolerância à glicose ou no *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico acordados, e nem alterações na resposta anti-lipolítica de adipócitos epididimais isolados, à insulina.

Outro aspecto importante está relacionado ao sistema nervoso simpático (SNS) que também apresenta uma importante função regulatória do metabolismo favorecendo, por exemplo, a lipólise e aumento de captação de glicose e, simultaneamente, sobre o sistema cardiovascular promovendo, por exemplo, vasoconstrição.

Interessantemente, a insulina também pode atuar sinergicamente relacionando a absorção dos nutrientes à atividade simpática. Esta relação entre insulina e atividade do sistema nervoso simpático pode ocorrer pela ação do hormônio leptina, liberado pelos adipócitos e que atua no sistema nervoso central promovendo a sensação de saciedade. A insulina promove aumento da expressão e da secreção de leptina pelo tecido adiposo branco, a qual aumenta a atividade do sistema nervoso simpático. Por uma alça de *feedback* negativo, as catecolaminas liberadas pela

ativação simpática inibem, via adrenoceptores β_3 , a expressão do gene responsável pela síntese deste hormônio pelas células adiposas (NONOGAKI, 2000).

Pode-se hipotetizar que, devido à hiperlipidemia mantida, a insulina sinaliza constantemente a secreção de leptina que, por sua vez, mantém o tônus simpático ativado, de forma a produzir efeitos tais como maior mobilização das reservas energéticas, favorecendo a manutenção da hiperlipidemia e da elevada glicemia de jejum, nos ratos com 6 semanas de ingestão de dieta, entretanto ratos com ingestão de dieta por 4 semanas estas alterações nas concentrações de leptina, de insulina, estoques de glicogênio não foram avaliadas, sendo assim alterações observadas neste período são exclusivamente decorrentes das altas concentrações de lipídeos circulantes que são os desencadeadores de todo o processo.

4.1.3 Análise Morfológica e Histológica do Tecido Hepático

A avaliação morfológica e histológica do tecido hepático confirma que a dieta administrada por 4 semanas já foi eficaz para a instalação do quadro de dislipidemia, causando inclusive esteatose hepática conforme relatado previamente por Miotto, 2001; Wolf-Nunes, 2004 e Miotto, 2006, quando administraram a dieta por 6 semanas.

Podemos observar na Figura 2, que os ratos tratados com dieta hiperlipídica por 4 semanas apresentaram hepatomegalia caracterizada por aumento no tamanho e peso do fígado. O fígado dos ratos hiperlipidêmicos apresentou coloração esbranquiçada com pontos escuros em toda extensão, além de consistência diferente daquela observada no grupo controle.

a)



b)

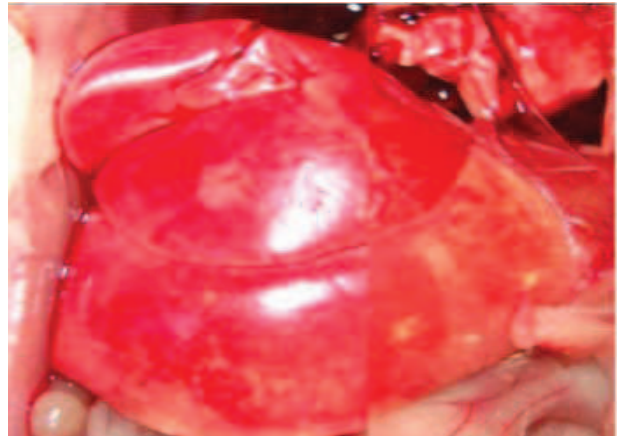


Figura 2: Foto ilustrativa do tecido hepático de ratos controle (a) e submetidos a dieta hiperlipídica (b) ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica tinha a seguinte composição: 15% de gordura de manteiga de cacau, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (HN&C Consultoria em Nutrição Experimental, Brasil).

A investigação histológica do fígado por meio de cortes corados com hematoxilina e eosina (HE) e também por Sudan Black B (Figura 3) confirmaram um quadro de esteatose hepática nos ratos tratados com a dieta rica em lipídios, observando-se a vacuolização do

citoplasma devido ao depósito de lipídios. Esses depósitos não são corados com HE, mas a coloração com Sudan Black B confirmou a deposição de lipídios no citoplasma dos hepatócitos desses animais. Como seria de esperar, a dieta rica em gordura induziu ao acúmulo de lipídios hepáticos no grupo Dieta (C), mostrando esteatose microvesicular ou macrovesicular ao redor da zona periportal, necrose e inflamação, juntamente com hepatócitos alargados. Deposição de gordura neste grupo foi classificada como mista.

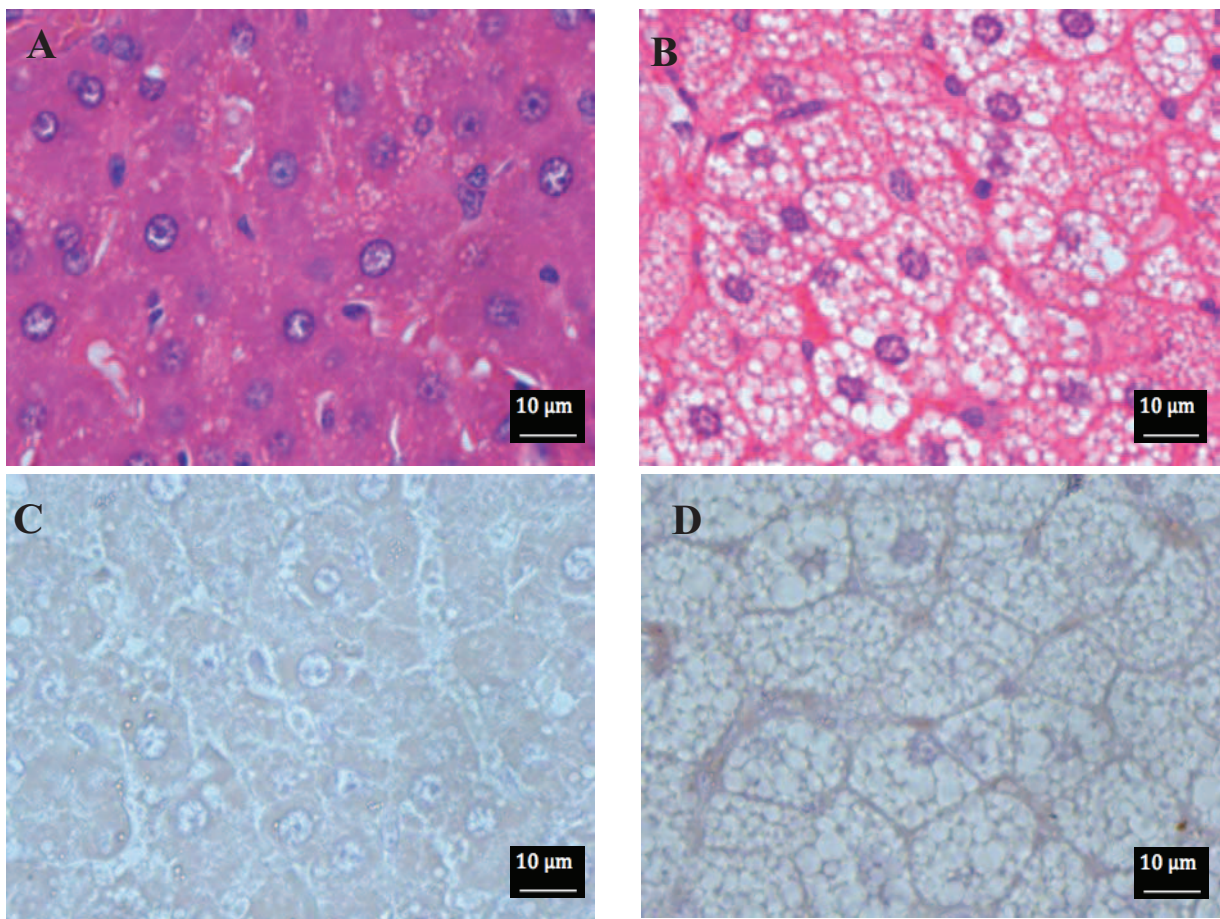


Figura 3: Fotomicrografia de cortes histológicos de tecido hepático retirado de ratos tratados com dieta padrão (A e C) e ratos tratados com dieta hiperlipídica por 4 semanas (B e D), sendo A e B coradas com hematoxilina e eosina enquanto C e D coradas com Sudan Black B.

4.2 Análise da Expressão Gênica por qRT-PCR

Diante dos resultados observados neste modelo de indução de dislipidemia pela dieta avaliamos os mecanismos moleculares envolvidos, analisando por técnica de qRT-PCR a expressão gênica das principais enzimas envolvidas no metabolismo lipídica e glicídico do tecido hepático e adiposo branco.

As amostras coletadas para análise por qRT-PCR foram preparadas segundo método do Trizol para posterior extração de RNA. Para garantir a integridade das amostras, estas foram analisadas em gel de eletroforese (Figura 4) e por Nanodrop (Tabela 3). Assim a constatação da integridade das amostras nos permitiu dar prosseguimento aos procedimentos.

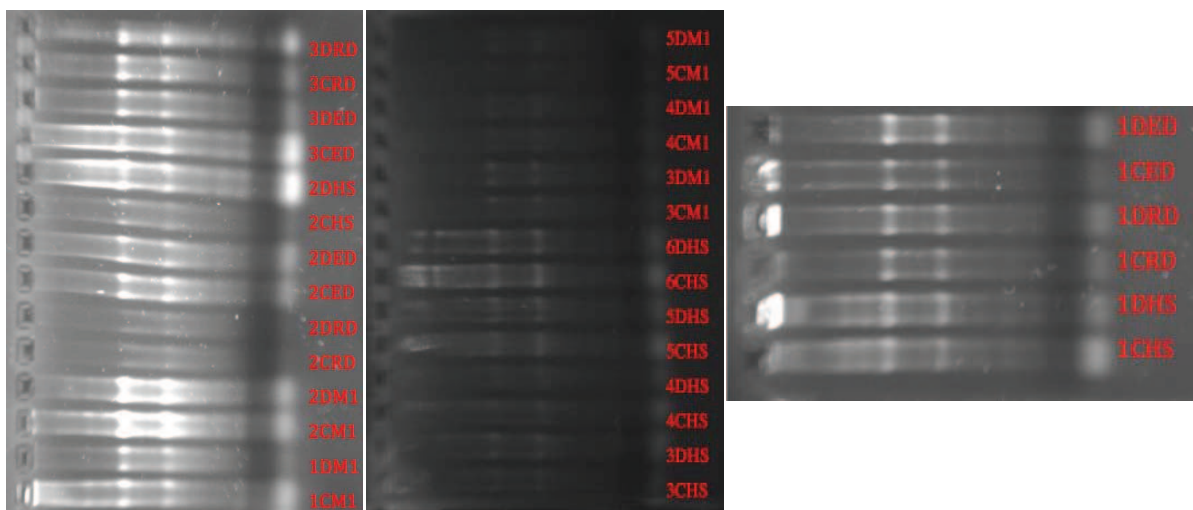


Figura 4: Gel de integridade das amostras de RNA extraídas das amostras de tecido adiposo epididimal, mesentérico e peri-renal e tecido hepático de animais controle e dieta administrada por 4 semanas. (DRD: animal dieta Peri-renal direito; CRD: animal controle Peri-renal direito; DM1: animal dieta amostra 1 do mesentérico; CM1: animal controle amostra 1 do mesentérico; DED: animal dieta epididimal direito; CED: animal controle epididimal direito; DHS: animal dieta hepático superior; CHS: animal controle hepático superior). Os números em frente às identificações indicam o número de marcas existentes no rabo do animal para identificação do mesmo.

Tabela 3: Análise das amostras de RNA extraídas das amostras de tecido adiposo epididimal, mesentérico e peri-renal e de tecido hepático de animais controle e dieta por 4 semanas por Nanodrop.

#	Sample ID	User	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	Branco - milliQ	Cris	30/7/2010 15:17:51	0,1	ng/µl	0,003	0,007	0,42	-0,2	RNA	40
2	1C HS	Cris	30/7/2010 15:19:11	9464,9	ng/µl	236,622	114,123	2,07	1,99	RNA	40
3	1D HS	Cris	30/7/2010 15:22:37	12,3177	µg/µl	307,943	150,67	2,04	1,77	RNA	40
4	1C RD	Cris	30/7/2010 15:24:00	1,1326	µg/µl	28,314	13,919	2,03	1,48	RNA	40
5	1D RD	Cris	30/7/2010 15:25:28	1,2191	µg/µl	30,477	15,316	1,99	0,72	RNA	40
6	1C ED	Cris	30/7/2010 15:26:54	1,2162	µg/µl	30,406	15,157	2,01	1,67	RNA	40
7	1D ED	Cris	30/7/2010 15:28:05	1,2844	µg/µl	32,111	15,595	2,06	1,21	RNA	40
8	100701.1	Cris	30/7/2010 15:29:34	0,2971	µg/µl	7,428	3,871	1,92	0,41	RNA	40
9	100701.2	Cris	30/7/2010 15:31:55	0,5765	µg/µl	14,414	7,191	2	1,42	RNA	40
10	100527.1	Cris	30/7/2010 15:33:30	0,2412	µg/µl	6,029	3,083	1,96	1,52	RNA	40
11	100527.2	Cris	30/7/2010 15:35:41	0,5292	µg/µl	13,231	6,451	2,05	1,49	RNA	40

#	Sample ID	User	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	1CM1	Cris	12/8/2010 14:35:49	3675,7	ng/µl	91,892	45,058	2,04	2,2	RNA	40
2	1DM1	Cris	12/8/2010 14:37:25	599,2	ng/µl	14,98	7,919	1,89	1,91	RNA	40
3	2CM1	Cris	12/8/2010 14:38:22	1720,4	ng/µl	43,009	21,795	1,97	2,19	RNA	40
4	2DM1	Cris	12/8/2010 14:39:16	881,2	ng/µl	22,031	11,097	1,99	1,86	RNA	40
5	2CRD	Cris	12/8/2010 14:40:01	122,3	ng/µl	3,057	1,702	1,8	0,46	RNA	40
6	2DRD	Cris	12/8/2010 14:41:01	484,4	ng/µl	12,109	6,315	1,92	1,52	RNA	40
7	2CED	Cris	12/8/2010 14:41:51	858,6	ng/µl	21,465	10,517	2,04	1,87	RNA	40
8	2DED	Cris	12/8/2010 14:42:32	236	ng/µl	5,9	3,029	1,95	0,85	RNA	40
9	2CHS	Cris	12/8/2010 14:43:24	8951,5	ng/µl	223,788	108,075	2,07	2,21	RNA	40
10	2DHS	Cris	12/8/2010 14:44:14	4559,5	ng/µl	113,987	56,623	2,01	2,16	RNA	40
11	3CED	Cris	12/8/2010 14:45:00	614,4	ng/µl	15,361	7,777	1,98	1,64	RNA	40
12	3DED	Cris	12/8/2010 14:46:11	596,7	ng/µl	14,917	7,654	1,95	1,74	RNA	40
13	3CRD	Cris	12/8/2010 14:46:55	662,5	ng/µl	16,563	8,554	1,94	2,02	RNA	40
14	3DRD	Cris	12/8/2010 14:47:39	567,4	ng/µl	14,186	7,325	1,94	1,93	RNA	40
15	2CRD2	Cris	12/8/2010 14:48:35	124,2	ng/µl	3,106	1,72	1,81	0,34	RNA	40

#	Sample ID	User	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	3CHS		18.02.11	8387,3	ng/µl	209,681	102,77	2,04	2,16	RNA	40
2	3DHS		18.02.11	4380,9	ng/µl	109,523	54,176	2,02	2,03	RNA	40
3	4CHS		18.02.11	9418,4	ng/µl	235,459	115,073	2,05	2,1	RNA	40
4	4DHS		18.02.11	3939,6	ng/µl	98,491	48,803	2,02	1,94	RNA	40
5	5CHS		18.02.11	7846,8	ng/µl	196,171	96,29	2,04	2,06	RNA	40
6	5DHS		18.02.11	3903,1	ng/µl	97,577	47,919	2,04	2,08	RNA	40
7	6CHS		18.02.11	7683,6	ng/µl	192,089	94,008	2,04	2,17	RNA	40
8	6DHS		18.02.11	4253	ng/µl	106,325	52,329	2,03	2,1	RNA	40
9	3CM1		18.02.11	873,6	ng/µl	21,839	11,229	1,94	1,31	RNA	40
10	EDM1		18.02.11	668,7	ng/µl	16,718	9,068	1,84	1,5	RNA	40
11	4CM1		18.02.11	904,9	ng/µl	22,621	11,857	1,91	1,13	RNA	40
12	4DM1		18.02.11	758,4	ng/µl	18,959	10,285	1,84	1,67	RNA	40
13	5CM1		18.02.11	1071,3	ng/µl	26,782	14,235	1,88	1,38	RNA	40
14	5DM1		18.02.11	1291,6	ng/µl	32,291	16,464	1,96	1,51	RNA	40
15	6CM1		18.02.11	1000,4	ng/µl	25,009	13,185	1,9	1,71	RNA	40
16	6DM1		18.02.11	1289,2	ng/µl	32,23	16,345	1,97	1,62	RNA	40
17	4CED		18.02.11	476	ng/µl	11,9	6,103	1,95	1,28	RNA	40
18	4DED		18.02.11	575,9	ng/µl	14,398	8,213	1,75	1,46	RNA	40
19	5CED		18.02.11	750,5	ng/µl	18,763	10,01	1,87	1,72	RNA	40
20	5DED		18.02.11	717,6	ng/µl	17,941	9,78	1,83	1,18	RNA	40
21	6CED		18.02.11	150,5	ng/µl	3,763	3,425	1,1	0,74	RNA	40
22	6DED		18.02.11	708,8	ng/µl	17,720	9,65	1,84	1,54	RNA	40
23	4CRD		18.02.11	723,9	ng/µl	18,097	9,578	1,89	1,07	RNA	40
24	4DRD		18.02.11	497,2	ng/µl	12,249	6,937	1,79	1,64	RNA	40
25	5CRD		18.02.11	832,5	ng/µl	20,814	10,724	1,94	0,7	RNA	40
26	5DRD		18.02.11	608	ng/µl	15,2	8,032	1,89	1,88	RNA	40
27	6CRD		18.02.11	507,9	ng/µl	12,698	7,111	1,79	1,23	RNA	40
28	6DRD		18.02.11	625,7	ng/µl	15,644	8,52	1,84	1,43	RNA	40

Confirmada a integridade das amostras prosseguimos com a transcrição para cDNA e análise das expressões gênicas por qRT-PCR .

4.2.1 Análise da expressão gênica de enzimas no tecido hepático

No tecido hepático foram analisadas as seguintes enzimas: LPL, PDK4, PFK1, Acaca, GyK e PDP2.

4.2.1.1 LPL hepática

Os tecido hepático dos ratos que ingeriram dieta por 4 semanas apresentou aumento significativo na expressão gênica da enzima LPL ($p < 0,05$) (Figura 5). Tratando-se de uma enzima chave do metabolismo lipídico participando como disponibilizadora lipídica e permitindo a absorção lipídica pelos tecidos, esse aumento reforça os dados histológicos que demonstraram acúmulo lipídico citoplasmático nos hepatócitos. A LPL aumentada estaria, portanto, promovendo uma maior absorção lipídica para o tecido hepático.

Segundo Brown et al. (2011) a atividade hidrolítica da LPL hepática de camundongos pode estar envolvida na regulação da via de transcrição de Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPARs), dado o papel destes receptores nucleares de ácido graxo que são ativados nas respostas pelo tecido hepático. Os PPARs (alpha, gama e delta) compõem uma família de fatores de transcrição ativada por ligantes que regulam o balanço energético, incluindo o metabolismo lipídico. Eles demonstraram que, em contraste com a LPL endotelial e LPL de tecidos extra-hepáticos, que ativam PPAR alpha, a LPL hepática hidrolisa VLDL para gerar predominantemente ativação da PPAR delta. Ao integrar esses dados com uma abordagem global de perfil metabólico, descobriram que a hidrólise de VLDL pela LPL hepática gera ácidos graxos insaturados específicos que podem induzir a uma resposta transcricional dependente de PPAR delta *in vitro* e *in vivo*, com efeitos funcionais gerando a formação de gotículas lipídicas celulares nos hepatócitos, provocando assim o quadro de esteatose hepática visível nas em nossas análises histológicas (Figura 3).

Em outro estudo com camundongos deficientes de LPL hepática (hl / -), foi relatado que embora estes animais apresentem peso corporal normal em uma idade jovem, com o tempo eles ganham menos peso e gordura corporal do que os controles com uma dieta padrão, e esse efeito é mais proeminente quando os ratos são alimentados com uma dieta hiperlipídica. Neste tipo de dieta, a redução do peso corporal em hl / - ratos foi associada a reduções significativas na porcentagem corporal de gordura e no tamanho da célula de gordura em comparação com controles selvagens, indicando que a deficiência de LPL hepática protege contra a obesidade induzida pela dieta. (CHIU et al., 2010).

O mecanismo delineado observou diferenças de peso corporal e massa gorda envolvendo tanto aumento modesto do gasto de energia quanto uma diminuição mais substancial na ingestão alimentar. Considerando que a deficiência de LPL hepática protege fortemente contra a esteatose hepática induzida por obesidade, foi pouco o impacto sobre as medidas do metabolismo da glicose.

Pode-se concluir que a LPL hepática é necessária para o controle do balanço energético e acúmulo de gordura corporal. Dessa maneira os resultados sugerem que o efeito da obesidade, induzida pela dieta, para causar esteatose hepática, mas não a resistência à insulina ou intolerância à glicose, é dependente da LPL hepática (CHIU et al., 2010).

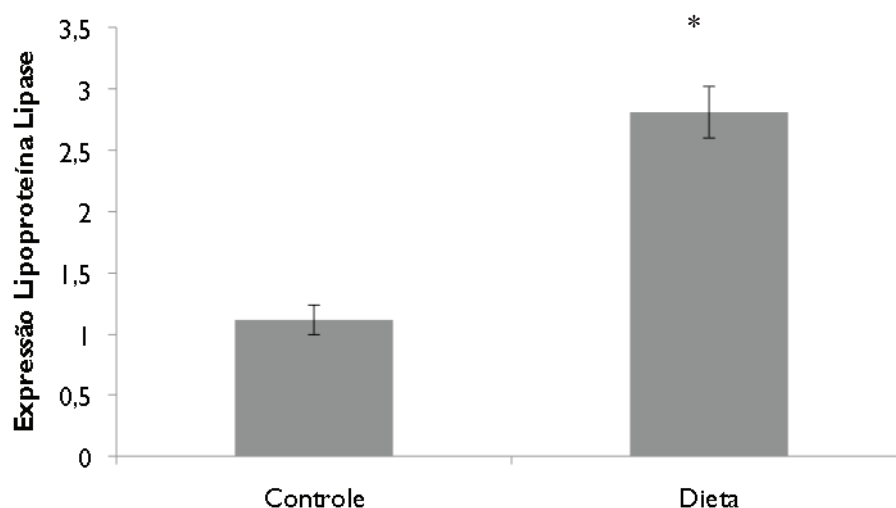


Figura 5: Expressão gênica da enzima *LPL* em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica a seguinte composição: 15% de gordura de manteiga de cacau, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (HN&C Consultoria em Nutrição Experimental, Brasil). * $p < 0,05$ - teste *t* Student. $n = 6$.

4.2.1.2 G6PC hepática

A enzima glicose-6-fosfatase (G6PC) catalisa a hidrólise de glicose-6-fosfato a glicose, que uma vez na corrente sanguínea se liga ao transportador da glicose 4 (GLUT4) presente na membrana celular dos tecidos alvos, permitindo a absorção de glicose do plasma e deposição no tecido adiposo e músculo. A expressão gênica da enzima glicose-6-fosfatase foi significativamente menor em tecido hepático de ratos submetidos a dieta hiperlipídica por 4 semanas em relação aos controles (Figura 6).

Este achado pode ser explicado devido ao fato da atividade enzimática da G6PC ser proporcional ao conteúdo intracelular de seu substrato, ou seja, glicose-6-fosfato que por sua vez tem sua produção aumentada em virtude do estímulo da glicogenólise e da gliconeogênese no jejum. Estudos feitos em ratos com 10 semanas de vida tratados por 40 semanas com dieta padrão

e hiperlipídica mostraram a instalação de um quadro de obesidade, o que não ocorre com os nossos animais devido ao tempo de tratamento de 4 semanas. Porém, neste estudo ocorre a diminuição da expressão gênica da subunidade catalítica da glicose-6-fosfatase (G6PC) hepática, uma enzima crítica envolvida na glicogenólise hepática e gliconeogênese, sendo esta alteração provavelmente uma resposta à hiperinsulinemia exibida em ratos obesos na idade de 30 semanas. (HOFFLER et al., 2009). Estes dados vão de encontro com nossos resultados apesar da diferença no tempo de tratamento, uma vez que estudos realizados em nosso laboratório verificaram aumento na concentração de insulina plasmática em animais alimentados com dieta hiperlipídica (WOLF-NUNES, 2004). Assim podemos inferir que a presença da insulina inibe os processos de glicogenólise e gliconeogênese reduzindo a concentração de glicose-6-fosfato, que por sua vez reduz a atividade da enzima G6PC e, portanto sua expressão gênica no tecido hepático.

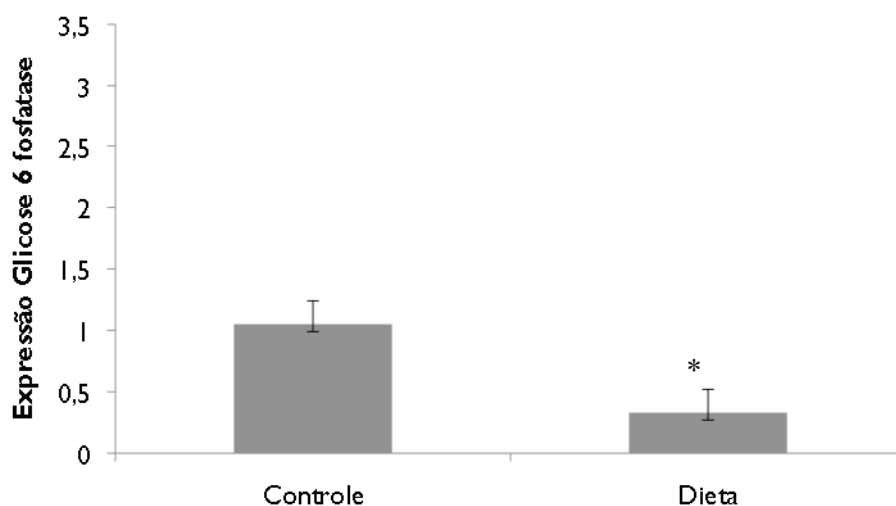


Figura 6: Expressão gênica da enzima **G6PC** em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica a seguinte composição: 15% de gordura de manteiga de cacau, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cítrico (HN&C Consultoria em Nutrição Experimental, Brasil) * $p < 0,05$ - teste t Student. $n = 6$.

4.2.1.3 PDK4 e PFK1 hepática

A expressão das enzimas PDK4 e PFK1 apresentaram significativamente aumentadas em tecido hepático de ratos submetidos a dieta hiperlipídica por 4 semanas (Figura 7).

O complexo piruvato desidrogenase (CPD) catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato (componente E1 – piruvato descarboxilase), a transferência do grupo resultante acetil para o HS-CoA (componente E2 - dihidrolipoil transacetilase) e a regeneração da lipoamida oxidada (componente E3 – dihidrolipoil desidrogenase) (MARZZOCO & TORRES, 2007).

A reação associa a glicólise ao metabolismo oxidativo, pois o produto acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico. A reação a este ponto crítico de ramificação no metabolismo é irreversível e, portanto, bem controlado. A principal regulação ocorre por fosforilação reversível do componente E1 do CPD, que inibe a atividade enzimática. O complexo PDH contém enzimas associadas reguladoras, incluindo piruvato desidrogenase quinase (PDK) e piruvato desidrogenase fosfatase (PDP). As atividades destas enzimas determinam a proporção de PDH em seu estado ativo, ou seja, desfosforilada. Sendo assim a atividade da PDK promove fosforilação do complexo e, portanto a sua inibição (HOUTEN et al., 2009).

A regulação da atividade do CPD desempenha um papel importante na adequação na atividade metabólica dos órgãos, o que significa a escolha de quais substratos um órgão irá usar para manter a homeostase energética. Em condições normais, condições de boa alimentação, a glicose é o substrato preferencial para a oxidação. Durante o jejum, no entanto, a beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos vai se tornar uma fonte de energia mais importante como uma alternativa para a glicose (HOUTEN et al., 2009).

Esta relação de reciprocidade entre a beta oxidação e a oxidação de glicose é conhecida como o ciclo da glicose-ácido graxo, ou ciclo de Randle (RANDLE et al., 1963). Na fisiologia normal, a função principal deste ciclo é poupar a glicose durante o jejum, quando a oferta de

glicose é limitada e os ácidos graxos livres plasmáticos e a beta oxidação estão elevados. O ciclo de Randle desempenha um papel crucial na fisiopatologia de doenças metabólicas, como diabetes tipo 2 (HUE & TAEGTMEYER, 2009).

A atividade de PDK é regulada por dois mecanismos de curto e longo prazo. Regulação a curto prazo inclui a ativação de PDK por produtos da reação da PDH, ou seja, acetil-CoA e NADH. Assim, alta taxa de acetil-CoA / CoA e NADH / NAD⁺ ativa PDK, levando a uma fosforilação inibitória do CPD. A atividade da PDK é inibida pelo próprio substrato, o piruvato (Figura 7). A longo prazo regulação da PDK ocorre principalmente ao nível da transcrição. Nos mamíferos, existem quatro PDKs, que têm diferentes propriedades bioquímicas e são expressas de forma tecido-específicas (BOWKER-KINLEY et al., 1998; PATEL & KOROTCHKINA, 2006; SUGDEN & HOLNESS, 2006; ROCHE & HIROMASA, 2007). PDK1 foi encontrada quase exclusivamente em coração de rato. Recentemente, foi descrito que PDK1 é um alvo para indução de hipóxia fator-1a (HIF-1a) (KIM et al., 2006; PAPANDREOU et al., 2006). Como tal, PDK1 desempenha um papel indispensável na adaptação de metabolismo celular à hipóxia.

PDK3 é abundantemente expressa em testículo de ratos, mas seu papel é relativamente inexplorado. PDK2 e PDK4 parecem desempenhar papéis adaptativos em jejum e em estado de fome. PDK2 é expressa e sua expressão aumenta significativamente no fígado e nos rins após jejum. A expressão de PDK4 é altamente responsiva em tecidos como músculo cardíaco, esquelético e hepático. A regulação da transcrição de PDK4 tem sido intensamente estudada nos últimos anos e elementos promotores funcionais foram identificados para o receptor glicocorticóide, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR), o receptor relacionado ao estrogênio e fatores de transcrição FOXO (ARAKI & MOTOJIMA, 2006).

Houten et al., 2009 mostraram que a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e ácidos graxos sinergicamente induzem a expressão de PDK4. AMPK é um sensor e regulador do

balanço energético celular (KAHN et al., 2005). AMPK é ativada por AMP que é um sinal para o estado de baixa energia, mas também por outras vias de sinalização tais como sinalização de adiponectina. A ativação da AMPK inicia uma cascata de sinalização destinada a restabelecer os níveis de energia celular. O principal evento é a fosforilação da Acetil-CoA carboxilase (ACC), que converte acetil-CoA em malonil-CoA. Malonil-CoA é um inibidor da carnitina palmitoiltransferase (CPT1), a primeira enzima no transporte da carnitina que é necessária para a importação de acil-CoA para dentro da mitocôndria. Como tal, CPT1 catalisa um passo limitante no caminho a beta oxidação.

Portanto, a ativação da AMPK tem como objetivo aumentar a produção de energia pela beta oxidação. O *crossstalk* entre ácidos graxos e *status* de energia na regulação da sinalização da expressão de PDK4 é completamente novo, e aumenta ainda mais nas células com dependência de ácidos graxos como fonte de energia (HOUTEN et al., 2009).

A superexpressão da PDK4 é largamente responsável pela inativação do complexo piruvato desidrogenase (CPD) em jejum. Camundongos *knockout* para a enzima PDK4 têm menor glicemia de jejum do que os camundongos do tipo selvagem, provando que a regulação por PDK4 é importante para a homeostase da glicose normal. Na diabetes tipo 2, o aumento da regulação do PDK4 também inativa o CPD, que promove a gliconeogênese e, assim, contribui para a hiperglicemia característica da doença. Quando alimentados com uma dieta rica em gordura, os camundongos do tipo selvagem desenvolvem hiperglicemia de jejum, mas camundongos *knockout* para a enzima PDK4 permanecem euglicêmicos, provando que a regulação por PDK4 contribui para a hiperglicemia em diabetes. Estes resultados sugerem que inibidores de PDK4 podem ser úteis no tratamento do diabetes tipo 2 (JEOUNG & HARRIS, 2010).

Já a PFK1 é uma enzima tetramérica que fosforila a frutose-6-fosfato com consumo de ATP em frutose-1, 6-bisfosfato e ADP, comprometendo glicose para a glicólise. Esta é uma reação irreversível e a partir deste ponto o substrato está forçado a proceder a rota glicolítica sendo, portanto a enzima mais importante na regulação da glicólise. Três isoenzimas PFK, codificadas por genes distintos, tem sido identificadas em mamíferos: PFKM encontrada no músculo, PFKL incidente no fígado e PFKP em plaquetas, as quais, portanto, são expressas de maneira tecido específica (GARCIA et al., 2009).

A PFK apresenta como efetadores alostéricos negativos, , ou seja, inibidores da atividade enzimática, ATP e citrato sendo os efetadores alostéricos positivos, AMP e frutose 2-6-bisfosfato. A frutose 2-6-bisfosfato é o efetador alostérico positivo mais potente no controle da via glicolítica, sendo sua produção submetida a controle alostérico e hormonal dependendo, portanto de duas ações catalíticas (quinase e fosfatase) presentes em domínios diferentes de uma enzima bifuncional: fosfofrutoquinase 2, sendo sua porção quinase a fosfofruto-2-quinase e a porção fosfatase representada pela frutose 2,6-bisfosfatase (MARZZOCO & TORRES, 2007).

Assim sendo quando a porção quinase esta favorecida a concentração da frutose 2,6-bisfosfato aumenta ativando por sua vez a fosfofrutoquinase-1 estimulando a glicólise e restringindo a gliconeogênese. Deste modo o teor de frutose 2,6-bisfosfato depende diretamente do nível de frutose 6-fosfato e inversamente do níveis de fosfoenolpiruvato. O aumento na concentração de fosfoenolpiruvato indica que este não esta sendo utilizado pela piruvato quinase ou que este está sendo produzido pela gliconeogênese. Em qualquer dos dois casos seus efeitos sobre a enzima bifuncional leva a diminuição da concentração de frutose 2,6-bisfosfato reduzindo a velocidade de ocorrência da glicólise abrindo caminho para que se complete a gliconeogênese (MARZZOCO & TORRES, 2007).

A atividade da enzima bifuncional também tem regulação mediada por hormônios. A enzima é substrato da PKA. Quando um dos resíduos de serina da enzima hepática é fosforilado o sítio ativo responsável pela síntese de frutose 2,6-bisfosfato é inibido e aquele responsável por sua degradação é estimulado; quando a enzima é desfosforilada a atividade exercida é a de quinase. Glucagon e adrenalina ativam PKA, que por sua vez fosforila a enzima bifuncional ativando a porção fosfatase, diminuindo a concentração de frutose 2,6-bisfosfato que atua como efetador alostérico negativo, inativando PFK1 no tecido hepático restringindo a glicólise e liberando a gliconeogênese. Já a insulina exerce um efeito inverso desfosforilando a enzima bifuncional e conseqüentemente estimula PFK1 hepática por aumento da concentração de frutose 2,6-bisfosfato acelerando a glicólise e inibindo gliconeogênese (MARZZOCO & TORRES, 2007).

Nossos dados demonstram que em animais tratados com dieta hiperlipídica por 4 semanas ocorre um aumento significativo na expressão gênica da PFK1 hepática inferindo um incremento na via glicolítica. A via glicolítica culmina na produção de piruvato que pode seguir duas vias distintas de acordo com a disponibilidade de oxigênio e a necessidade energética. O piruvato em condições anaeróbias sofre oxidação anaeróbia gerando lactato. Já em condições aeróbias o piruvato sofre oxidação aeróbia, ou seja, o piruvato produzido no citossol na via glicolítica é transportado para mitocôndria pela piruvato translocase e lá será oxidado. O primeiro passo desse processo é a conversão do piruvato a acetil-CoA por descarboxilação oxidativa catalisada pelo CPD como visto anteriormente.

Nossos resultados demonstram que o aumento da expressão gênica da PDK4 estaria inativando este complexo e, portanto a conversão de piruvato a acetil-CoA estaria reduzida. Se PFK1 está superexpressa produzindo piruvato e este não está seguindo a via de oxidação aeróbia, para onde está indo este piruvato?

Em situação de jejum e na atividade física, por exemplo, ocorre a inibição do CPD selecionando assim o substrato a ser preferencialmente consumido, glicose ou ácidos graxos, favorecendo a utilização de ácidos graxos sendo este mecanismo crucial para economia de glicose. Os ácidos graxos são utilizados assim, como substrato energético pelo tecido muscular esquelético, cardíaco, hepático e etc., poupando glicose para os tecidos exclusivamente glicolíticos. A inativação da piruvato desidrogenase facilita a oxidação de ácidos graxos por economizar piruvato para formação do oxaloacetato, cuja oferta ao ciclo de Krebs permite oxidar acetil-CoA.

Tendo em vista que não existem vias para converter acetil-CoA a glicose em mamíferos, o bloqueio da piruvato desidrogenase permite preservar, além da própria glicose, compostos gliconeogênicos quando o açúcar é insuficiente. No fígado, o piruvato disponível pode formar oxaloacetato que ganha acesso a gliconeogênese, então estimulada, sintetizando glicose. A acetil-CoA originada de ácidos graxos não só causa a supressão da oxidação de piruvato, como também estimula a carboxilação de piruvato a oxaloacetato; a acetil-CoA é o efetuator comum as duas reações. Está seria uma possível hipótese do caminho do piruvato acumulado por inibição do CPD pelo tratamento com dieta hiperlipídica.

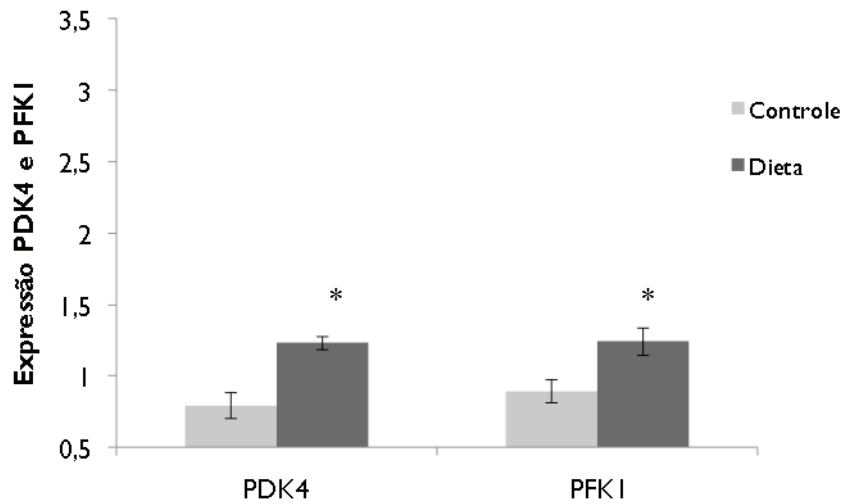


Figura 7: Expressão gênica das enzimas *PDK4* e *PFK1* em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica a 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). * $p < 0,05$ - teste *t* Student. $n = 6$.

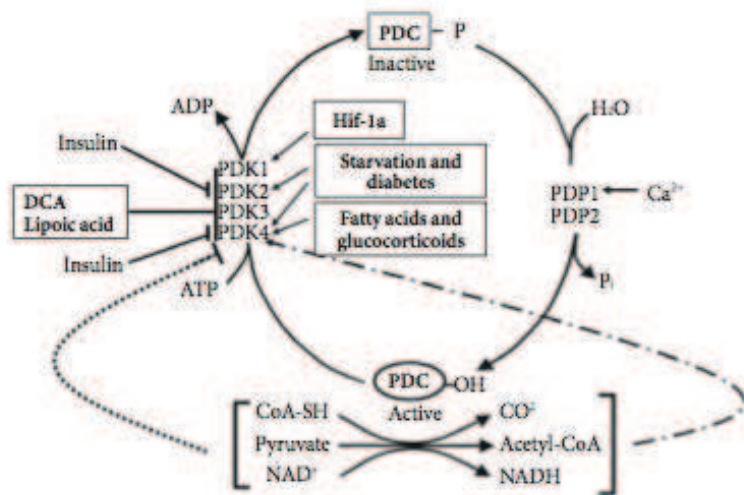


Figura 8: Regulação do complexo piruvato desidrogenase (CPD) e suas quinases (PDKs) e fosfatase (PDPs). DCA: dicloroacetato; Lipoic acid: ácido lipóico; Insulin: insulina; Fatty acids and glucorticoids: ácidos graxos e glicocorticóides; Starvation and diabetes: Estado de fome e diabetes; Inactive: inativo; Pyruvate: piruvato; Active: ativo; Acetyl-CoA: acetil-CoA. Adaptado de Jeoung et al., 2010.

4.2.1.4 Acaca hepática

Em nossos resultados a expressão gênica da acetil-CoA carboxilase alpha (Acaca) em tecido hepático de ratos submetidos a dieta hiperlipídica por 4 semanas não se alterou significativamente quando comparados os dados do grupo controle (Figura 9).

A Acc catalisa a síntese de malonil-CoA, que é tanto um intermediário na síntese de ácidos graxos como um inibidor alostérico da carnitina palmitoiltransferase (CPT1) (MUNDAY & HEMINGWAY, 1999; MUNDAY, 2002). CPT1 regula a transferência de cadeia longa acil-CoA (LCCoAs) do citosol para a mitocôndria, onde são oxidados (SAVAGE et al., 2006).

Malonil-CoA é, portanto, um regulador fisiológico chave tanto da síntese de ácidos graxos (WAKIL et al., 1983) quanto da oxidação (McGARRY, 1997). Há duas isoformas de Acc em roedores e seres humanos; ACACA é altamente expresso no fígado e tecido adiposo enquanto Acacb é predominantemente expressa no coração e músculo esquelético e, em menor medida, no fígado (ABU-ELHEIGA et al., 2001). Apesar de serem codificadas por genes separados, ACACA e Acacb apresentam identidade de sequência considerável (85% excluindo a extensão terminal N de Acacb) e têm a mesma estrutura de domínio responsável pela atividade da enzima (SAVAGE et al., 2006).

Estudo utilizando as propriedades farmacocinéticas de oligonucleotídeos antisense (ASOs) permitiu examinar *in vivo* reduções de mRNA alvo no fígado sem causar qualquer mudança na expressão Acc no músculo. Os resultados sugerem que tanto ACACA quanto Acacb estão envolvidos na regulação da oxidação de gordura no fígado, enquanto que apenas ACACA sintetiza malonil-CoA para a síntese de gordura, e que a diminuição na expressão tanto de ACACA quanto de Acacb com um simples Acc ASO (acc1 e -2) inverte esteatose hepática e resistência à insulina hepática em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, proporcionando uma

nova opção terapêutica para o tratamento da doença do fígado gorduroso não-alcóolica (NAFLD) (SAVAGE et al., 2006).

A alimentação rica em gordura em ratos provoca acúmulo de lipídios hepáticos e resistência à insulina dentro de 3 dias (SAMUEL et al., 2004). O padrão de LCCoA acumulado (ácido linoléico [18:02] é o principal ácido graxo constituinte da dieta utilizada neste estudo e os principais LCCoA detectáveis em extratos de fígado nesses ratos) sugere que esta é principalmente uma consequência da reesterificação de ácidos graxos ao invés de nova lipogênese (SAMUEL et al., 2004). O ácido graxo acil-CoA 18:02 é também o Acil-Coa de cadeia longa dominante e o ácido graxo dominante na fração diacilglicerol no fígado de ratos após 4 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, sugerindo que reesterificação continua a ser o fator dominante no desenvolvimento da esteatose hepática nestes animais.

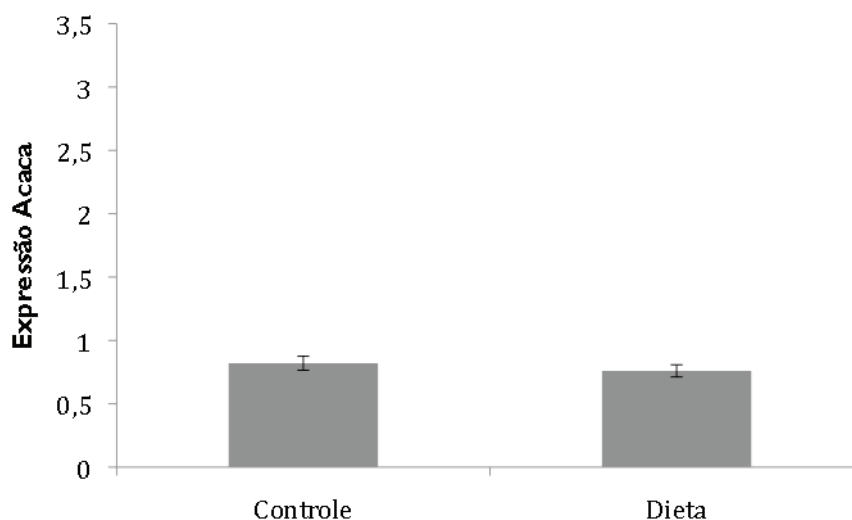


Figura 9: Expressão gênica da enzima *Acaca* em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica a seguinte 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). n = 6.

4.2.1.5 GyK hepática

A glicerolquinase (GyK) catalisa a fosforilação do glicerol em glicerol-3-fosfato o qual é importante na formação de triacilgliceróis (TAGs) e armazenamento lipídico. O GyK está na interface do metabolismo de lipídios e carboidratos (RAHIB et al., 2007). Nossos resultados não demonstraram alteração significativa na expressão gênica da GyK no tecido hepático de ratos submetidos a dieta por 4 semanas quando comparados aos controle (Figura 10).

O fígado desempenha um papel central no metabolismo do glicerol, uma vez que é responsável por 70-90% do glicerol corporal (RESHEF et al., 2003). As aquagliceroporinas (AQP3, AQP7, AQP9 e AQP10) englobam uma subfamília de aquaporinas, que permitem o movimento da água e outros solutos pequenos, especialmente o glicerol, através da membrana celular. A aquaporina 7 (AQP7) representa a principal porta de entrada para o fornecimento de gordura derivadas do glicerol, enquanto o glicerol entra nos hepatócitos via aquaporina 9 (AQP9), onde é convertido em glicerol-3-fosfato, um precursor da gliconeogênese e uma fonte direta para a síntese de TAGs (RODRÍGUEZ et al., 2006; MAEDA et al., 2008). O piruvato também constitui uma fonte de glicerol-3-fosfato pela atividade enzimática da piruvato carboxilase (PC) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (RESHEF et al., 2003). A insulina inibe a gliconeogênese, reduzindo a atividade da PEPCK, bem como pelo bloqueio da glicogenólise (ie, a conversão de polímeros de glicogênio para monômeros de glicose) (RODRÍGUEZ et al., 2006).

A AQP9 constitui o canal de glicerol mais importante em hepatócitos e está localizada na membrana plasmática sinusoidal que enfrenta a veia portal (ISHIBASHI et al., 1998; CARBREY et al., 2003).

A regulação das aquagliceroporinas induzida por insulina em hepatócitos humanos também parece ser diferente do controle que ocorre em ratos, uma vez que a insulina supra-regula

a expressão de aquagliceroporinas em células hepáticas de humanos (RODRÍGUEZ et al., 2011). O aumento da AQP3 e AQP7, dois canais de glicerol em torno das gotículas de lipídios, mediada por insulina pode refletir em um conteúdo aumentado de TAGs intra-hepatocelular, dado que a insulina induz esteatose hepática por meio da ativação da expressão de genes lipogênicos (POSTIC & GIRARD, 2008). Por outro lado, a supra-regulação de AQP9 induzida por insulina, pode favorecer influxo de glicerol em hepatócitos (Figura 10) (RODRÍGUEZ et al., 2011). Os pacientes obesos com diabetes tipo 2 apresentam uma AQP9 hepática diminuída, compatível com um mecanismo compensatório que visa reduzir a entrada de glicerol em hepatócitos e melhorar ainda mais o desenvolvimento de hiperglicemia (CATALAN et al., 2008; MIRANDA et al., 2009; RODRÍGUEZ et al., 2011).

A esteatose hepática é caracterizada pelo acúmulo de TAGs em hepatócitos e varia de acúmulo simples de gordura (esteatose), a esteatohepatite não alcoólica (NASH) e à cirrose (irreversível, deterioração avançada do fígado) (WIDHALM & GHODS, 2010). AQP9 foi proposta como uma terapia farmacológica para NAFLD-NASH (WIDHALM & GHODS, 2010). Neste sentido, Rodriguez et al., 2011 forneceram evidências de que mRNA de AQP9 hepático foi negativamente correlacionada com o conteúdo lipídico intra-hepático em pacientes obesos. No entanto, Miranda et al., 2009 não encontraram nenhuma relação entre a expressão de AQP9 e o grau de esteatose hepática ou fibrose em pacientes obesos mórbidos. Em linha com esta observação, nenhuma anormalidade histológica aparente foi mostrada nas seções hepáticas de ratos transgênicos *knockout* para a AQP (ECKEL, 2005; HIBUSE et al., 2006).

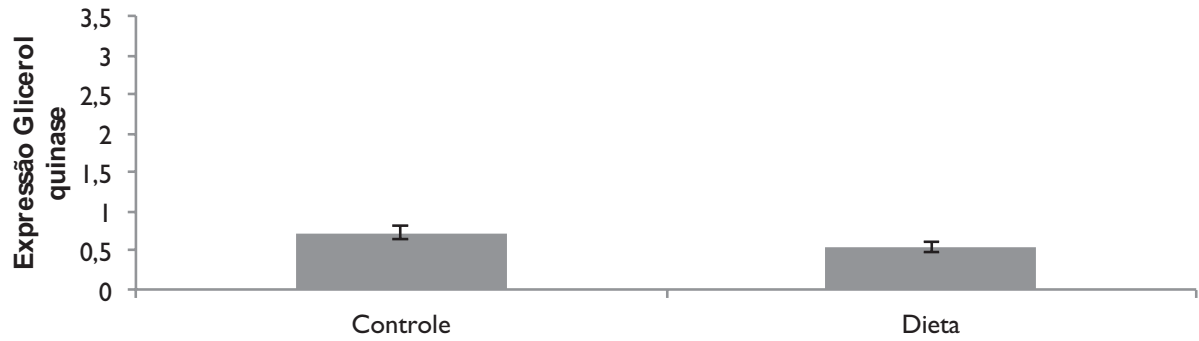


Figura 10: Expressão gênica da enzima **GyK** em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica a seguinte 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). n = 6.

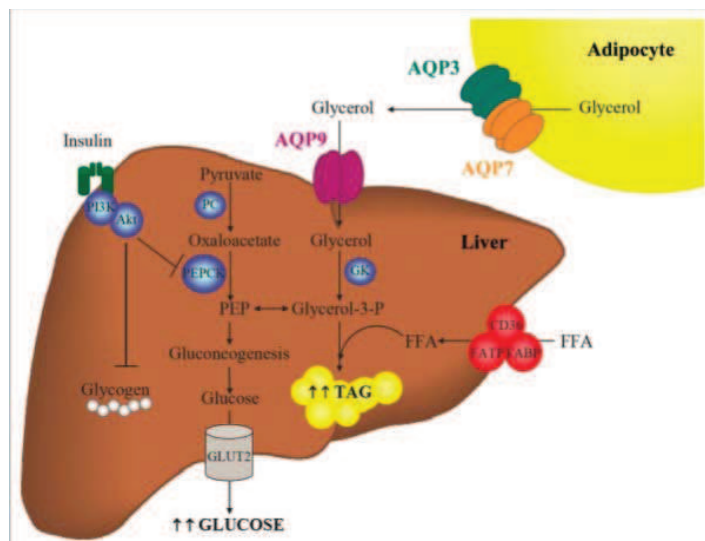


Figura 11: Participação de AQP9 na gliconeogênese hepática e esteatose. Durante o jejum, os adipócitos induzem a liberação de glicerol através AQP3 e AQP7 enquanto hepatócitos favorecem a captação de glicerol através AQP9. Glicerol é fosforilado por GK para produzir glicerol-3-fosfato, um precursor da gliconeogênese e uma fonte direta de glicerol-3-fosfato para a síntese de novos triacilgliceróis. Regulação coordenada pelas aquagliceroporinas adiposa e hepática é necessária para manter um equilíbrio correto entre acúmulo de gordura, gliconeogênese hepática e esteatose. FFA, ácidos graxos livres; GK, glicerol quinase, transportador de glicose GLUT; PC, piruvato carboxilase; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPCK, carboxicinase fosfoenolpiruvato; TAG, triacilgliceróis; Insulin: insulina; Glycogen: glicogênio; Pyruvate:piruvato; Oxaloacetate: oxaloacetato; Gluconeogenesis: gliconeogênese; Glucose: glicose; Glycerol: glicerol; Glycerol 3-P: glicerol 3-fosfato; Adipocyte: adipócitos. Adaptado de RODRIGUEZ, 2011.

4.2.1.6 PDP2 hepática

A atividade do Complexo Piruvato Desidrogenase (PDP2) é rigidamente controlada por um ciclo de fosforilação / desfosforilação, com o grau de fosforilação do complexo determinada pelas atividades relativas da piruvato desidrogenase quinase (PDK) *versus* a piruvato desidrogenase fosfatase (PDP). Alterações induzidas na atividade PDK relativa à atividade PDP durante as transições a diferentes estados nutricionais e hormonais levam a mudanças substanciais no estado de fosforilação e, portanto, o estado de atividade do complexo (HUANG et al., 2003).

Nossos resultados não demonstraram alteração significativa na expressão gênica da PDP2 em tecido hepático isolado de ratos submetidos a dieta hiperlipídica (Figura 12), porém em relação a PDK4 analisada anteriormente houve aumento na expressão gênica em tecido hepático de ratos submetidos a dieta hiperlipídica por 4 semanas quando comparados aos ratos do grupo controle.

A sobrevivência durante o jejum é dependente de mecanismos que limitam a perda oxidativa do piruvato em tecidos não neuronais do organismo. Piruvato e outros três compostos de carbono que podem ser convertidos em glicose devem ser conservados durante o jejum. A reciclagem eficiente destes compostos é particularmente importante para limitar a utilização de aminoácidos glicogênicos que de outra forma teriam de ser usados para manter os níveis de glicose durante o jejum (HUANG et al., 2003).

Limitar o volume de aminoácido ajuda a manter a proteólise em cheque e conserva proteína corporal. A inibição da oxidação do piruvato é alcançada por uma combinação de mecanismos reguladores que virtualmente eliminam a atividade da piruvato desidrogenase de células não neuronais durante o jejum. A mais importante delas é a modificação covalente do complexo por fosforilação (HUANG et al., 2003).

O equilíbrio entre as atividades relativas dos PDKs e PDPs determina o grau em que o complexo é inibido por fosforilação. Está bem estabelecido que a expressão aumentada em PDK no jejum desloca o equilíbrio para uma maior fosforilação do complexo. Não está bem definido se ocorrem mudanças na atividade estável da PDP. Parte do aumento na atividade PDK induzida pelo jejum é devido as concentrações elevadas de ácidos graxos livres e corpos cetônicos. O catabolismo destes compostos aumenta os níveis de NADH e acetil-CoA, que por sua vez, aumentam a atividade da PDK reduzindo a acetilação dos resíduos lipoil do componente E2 do complexo (HUANG et al., 2003). Complementando esse mecanismo ocorre aumento acentuado

na expressão de PDK4 em muitos tecidos (WU et al., 1998; WU et al., 1999; WU et al., 2000; WU et al., 2001), juntamente com o aumento da expressão PDK2 em alguns poucos tecidos (WU, et al., 2000; SUGDEN et al., 2000). Alterações nos níveis sanguíneos de glicocorticóides, insulina e ácidos graxos livres sinaliza aumento na expressão de PDK4 em jejum (HUANG et al., 2002).

Assim sendo, nossos resultados corroboram com os dados encontrados na literatura onde a relação a atividade das unidades regulatórias do complexo, uma vez que obtivemos aumento na expressão gênica da PDK4 e a não alteração da expressão gênica da PDP2.

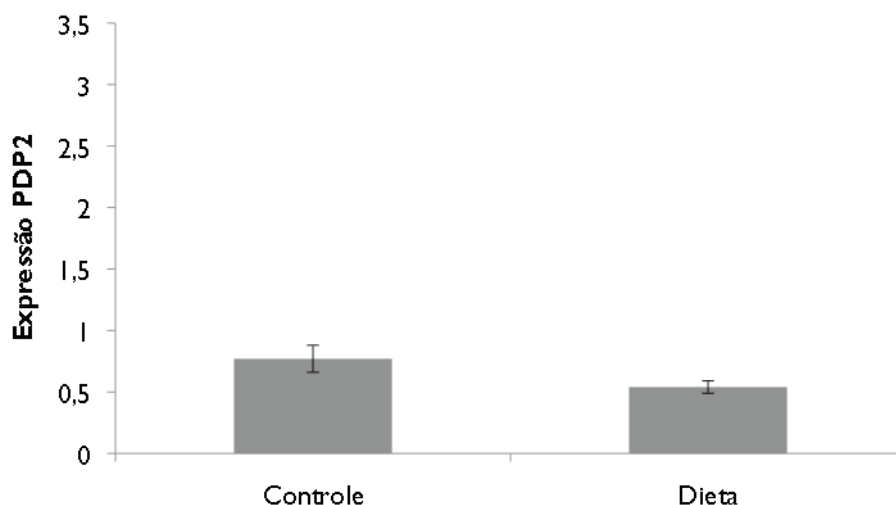


Figura 12: Expressão gênica da enzima *PDP2* em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica a seguinte 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). * $p < 0,05$ - teste *t* Student. $n = 6$

Sendo assim, em relação ao tecido hepático, o tratamento por quatro semanas de ratos com dieta hiperlipídica obteve em relação a lipogênese, aumento na expressão gênica de LPL, sem apresentar alteração significativa na expressão gênica da Acaca e Gyk reforçando a hipótese

de esteatose por reesterificação. Os processos de glicogenólise e gliconeogênese estariam inibidos por diminuição na expressão gênica de G6PC, embora os animais tenham ficado em jejum de 16 horas demonstrando que possivelmente a hiperinsulinemia regula negativamente a expressão enzimática. A glicólise por sua vez está provavelmente ativada por aumento na expressão gênica da PFK1, por estímulo insulínico sobre efetador alostérico positivo Frutose 2-6 bisfosfato. Dessa maneira a glicose estaria sendo convertida a piruvato e este poderia estar sendo convertido em acetil-CoA. Porém estes animais dieta apresentam um aumento na expressão gênica de PDK4 inferindo, portanto inibição do CPD e portanto a não conversão de piruvato a acetil-CoA. Qual seria então o destino do piruvato? Este pode ser convertido a lactato pela enzima lactato desidrogenase ou a oxaloacetato pela enzima piruvato carboxilase, porém estudos posteriores serão necessários para avaliar a expressão e a atividade dessas enzimas neste modelo de dislipidemia. Além desses dados, também verificamos neste modelo que o glicogênio hepático não sofre depleção, sendo também interessante analisar a enzima glicogênio sintase (Figura 13).

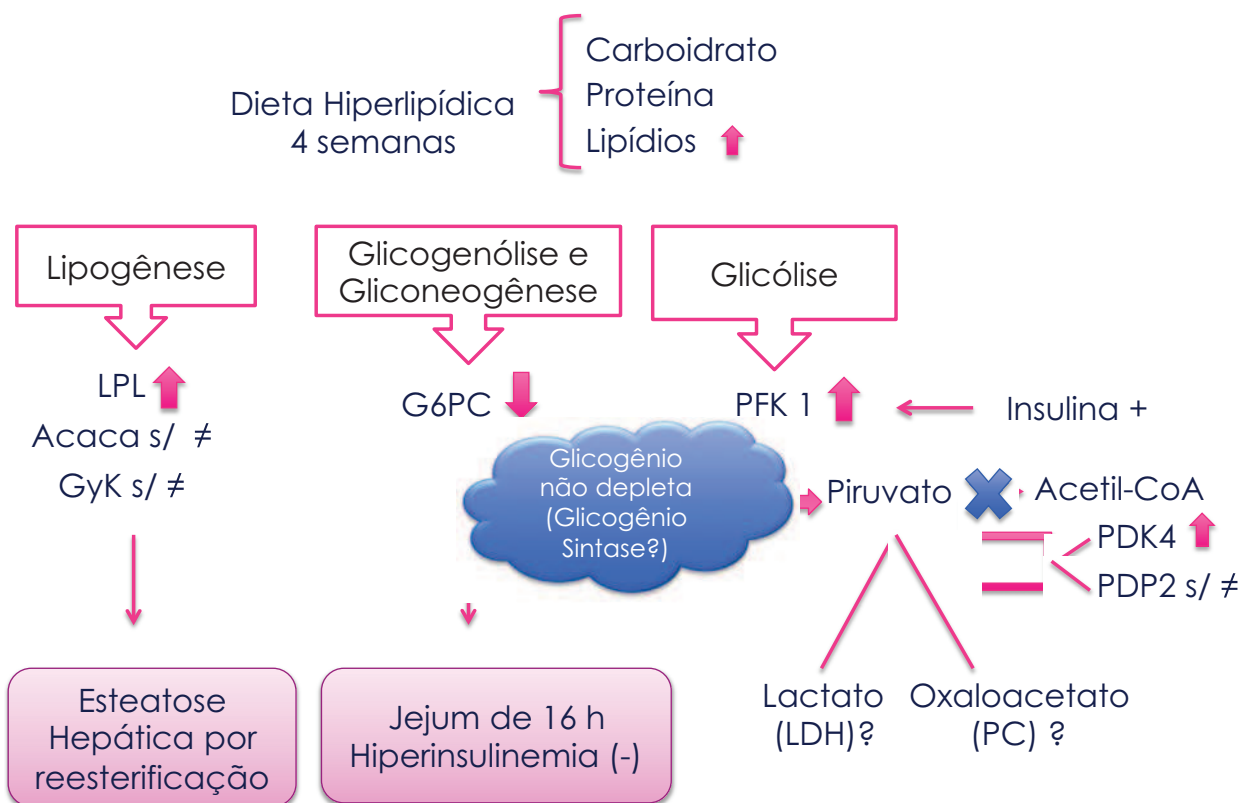


Figura 13: Esquema resumido das alterações apresentadas na expressão gênica das enzimas em tecido hepático isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica a seguinte composição: 15% de gordura de manteiga de cacau, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido fólico (HN&C Consultoria em Nutrição Experimental, Brasil).

4.2.2 Análise da expressão gênica de enzimas no tecido adiposo

O tecido adiposo branco (TAB) desempenha papel importante na regulação da homeostase energética de todo o organismo. Um de seus papéis principais é a liberação de ácidos graxos em condições de balanço energético negativo, ou exercício prolongado para fornecer energia para os tecidos periféricos. As maquinarias moleculares envolvidas na quebra de triacilglicerol (TAG) e liberação de ácidos graxos funcionam de forma ordenada e regulada, conferindo ao tecido adiposo branco a capacidade de responder a diversas condições de alimentação e às demandas energéticas corporais. Importante destacar que, nas condições que levam o excesso de ingestão alimentar e obesidade, ocorre alteração na regulação normal da lipólise no TAB (GAIDHU et al., 2010).

Na verdade, a lipólise basal tem sido repetidamente relatada como elevada, enquanto a lipólise induzida por catecolaminas é suprimida em humanos e roedores obesos (JOCKEN & BLAAK, 2008). O mecanismo clássico para explicar esta condição está centrado no fato de que o TAB expandido de indivíduos obesos se torna resistente à insulina, prejudicando os principais efeitos lipogênicos e anti-lipolíticos deste hormônio.

A obesidade se desenvolve em condições de excesso de energia crônica, indicando que adipócitos viscerais (AV) e subcutâneos (AS) devem ser capazes de lidar com grandes quantidades de lipídios a serem entregues ao TAB para armazenamento. Neste cenário, a capacidade dos adipócitos para lidar com excesso de lipídios através de alterações no metabolismo de ácidos graxos pode desempenhar um importante papel nas respostas adaptativas do TAB para a obesidade. Importante, a obesidade é invariavelmente acompanhada por aumento nas concentrações circulantes de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (ARNER, 2005; STUMVOLL et al., 2005; BAYS et al., 2008), indicando que a regulação de armazenamento de

energia e mobilização de ácidos graxos dos adipócitos viscerais e subcutâneos está com defeito em seu funcionamento.

Embora exista literatura descrevendo as diferenças entre adipócitos viscerais e depósitos de gordura subcutânea a fim de elucidar as distintas taxas lipolíticas (BOLINDER et al., 1983; MAURIEGE et al., 1987; SZTALRYD et al., 1994), os mecanismos celulares e moleculares responsáveis por essas características depósito-específico ainda precisam ser elucidadas. Isto é particularmente importante porque é o acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo visceral (obesidade visceral) que tem sido fortemente correlacionado com o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2 (ARNER, 2005; JENSEN, 2008). Neste cenário, desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na desregulação de lipólise e metabolismo lipídico no tecido adiposo visceral e subcutâneo na obesidade pode ser de grande relevância terapêutica.

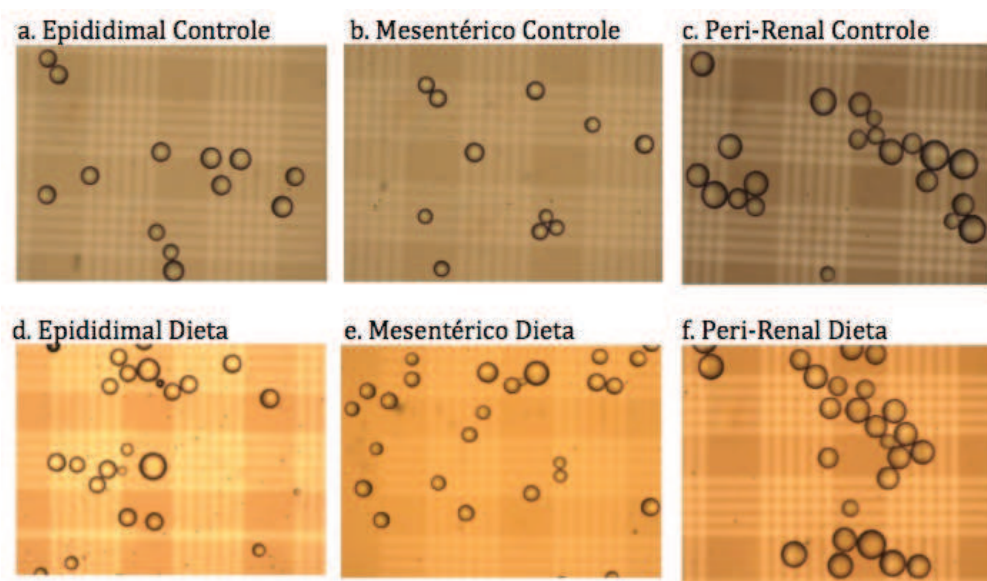
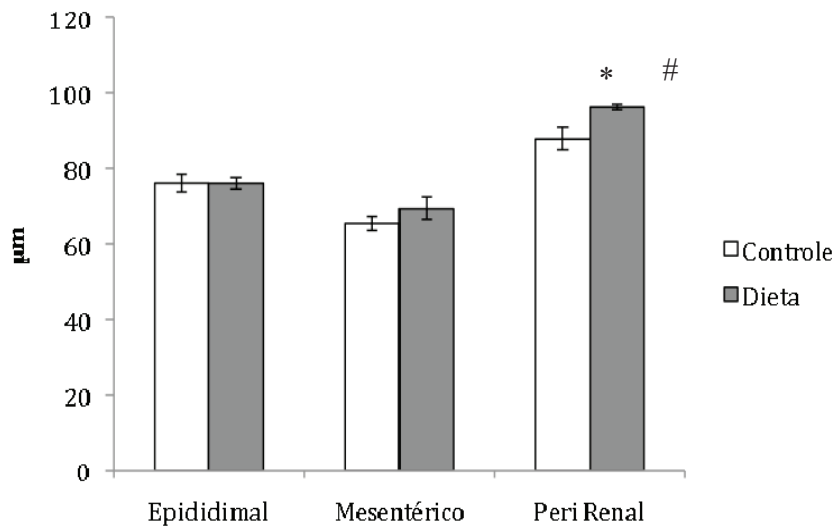


Figura 14: Fotomicrografia de adipócitos isolados das regiões epididimal (a, d), peri-renal (b, e) e mesentérica (c, f) de ratos controle (painéis superiores) e de ratos ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas (painéis inferiores). Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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) Área



b) Diâmetro

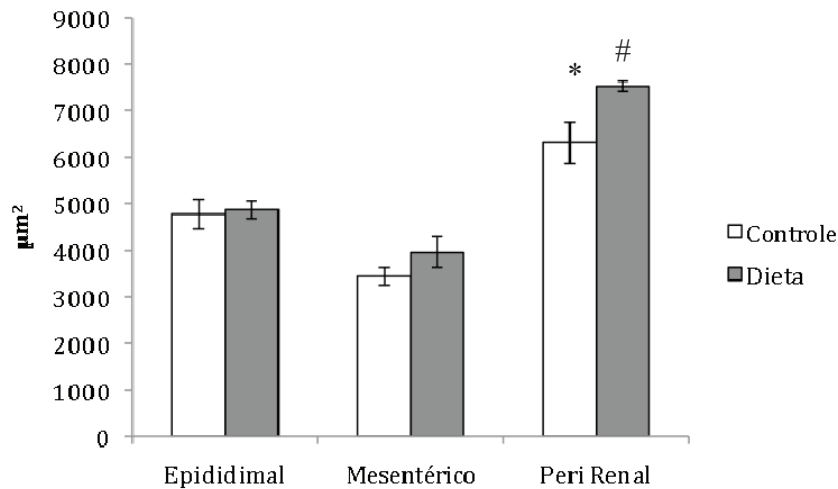


Figura 15: Morfometria de adipócitos isolados do panículo adiposo da região epididimal, mesentérica e Peri-renal de ratos controle e de ratos que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. A morfometria foi avaliada pela análise da área (a) e diâmetro (b) dos adipócitos isolados. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). Controle vs dieta - test t Student ns. Diferentes depósitos em um mesmo grupo: Anova seguida de Tukey.

* PR vs M $p < 0,05$ controle e * PR vs Epididimal $p < 0,05$ controle.

PR vs M $p < 0,05$ dieta e * PR vs Epididimal $p < 0,05$ dieta.

Gaidhu et al., 2010, em estudo com ratos tratados com dieta hiperlipídica por 8 semanas demonstrou que ratos do grupo dieta tinham uma média de massa corporal 36% maior do que os animais controle, que foi acompanhado por um aumento de 3,0 e 2,8 vezes do depósito adiposo epididimal e inguinal, respectivamente. Este era compatível com um aumento de 1,67 e 1,59, vezes nos diâmetros dos adipócitos epididimais e inguinais do grupo dieta, respectivamente.

Nossos resultados mostram que a administração de dieta por 4 semanas não alterou o tamanho dos adipócitos isolados das regiões analisadas ou seja epididimal, mesentérica e per-renal. Neste estudo não avaliamos os pesos dos depósitos de gordura como fez Wolf-Nunes, 2004 que identificou aumento no peso dos panículos das regiões epididimal e peri-renal nos ratos que ingeriram dieta por 6 semanas.

Poderíamos inferir que 4 semanas de administração de dieta não são suficientes para aumentar o depósito de lipídeos nos adipócitos e que este excesso está sendo depositado exclusivamente no leito hepático devido a esteatose. Entretanto avaliamos a expressão das enzimas lipoproteína lipase, responsável pela captura de lipídeos para os adipócitos bem como a enzima lipase hormônio sensível, responsável pela degradação destes estoques, e os resultados estão apresentados a seguir.

4.2.2.1 HSL no tecido adiposo

A análise da expressão gênica da enzima lipase hormônio-sensível não demonstrou diferença significativa no tecido adiposo epididimal e apresentou-se significativamente aumentada nos tecidos adiposo mesentérico e peri-renal (Figura 16).

A lipólise no tecido adiposo branco de humanos e roedores é regulada fase a fase pela lipase de triacilglicerídios adiposo (ATGL), lipase hormônio-sensível (HSL) e lipase de monoacilglicerol (MAGL) (LARGE & ARNE, 1998; ARNER, 2005; LAFONTAN & LANGIN,

2009). O modelo atual é que ATGL inicia a lipólise pela primeira clivagem de TAG e, em seguida, HSL e MAGL promovem a clivagem do diaciglicerol (DAG) e monoacilglicerol, respectivamente, lançando dois ácidos graxos adicionais e uma molécula de glicerol (LAFONTAN, 2009). Portanto, a ativação orquestrada de ATGL, HSL, e MAGL parecem ser necessárias para a lipólise completa ocorrer em adipócitos. A ligação de agonistas adrenérgicos, acoplados a adenilato ciclase através da proteína G estimulatória, leva aumento na concentração de AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA) (FRAYN et al., 2003; ARNER, 2005).

Em HSL de ratos, a PKA fosforila resíduos de serina 563, 659 e 660 (ANTHONSEN, 1998; SHEN, 1998; ARNER, 2005), levando a translocação de HSL para a gota lipídica e para grande reforço da lipólise. A fosforilação da perilipina A, uma proteína associada à gota lipídica, por PKA também tem sido demonstrada ser necessária para ativação da HSL e ocorrência da lipólise induzida por catecolaminas. Por outro lado, o sensor de energia celular, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) tem sido demonstrada por fosforilar a serina-565 da HSL, o que impede a fosforilação mediada por PKA desta enzima e prejudica a lipólise estimulada por catecolaminas (GARTON et al., 1989).

Neste contexto, a AMPK tem sido proposta por reduzir a liberação de ácidos graxos na circulação, o que poderia ajudar a prevenir lipotoxicidade nos tecidos periféricos, bem como reduzir o dispendioso processo de reesterificação de ácidos graxos no tecido adiposo branco.

A literatura atual sugere que em roedores magros ATGL e HSL são as principais lipases para TAG e DAG, respectivamente, e respondem por 95% da atividade lipase em TAB de murinos (SCHWEIGER, 2006). Portanto, essas etapas moleculares que regulam a lipólise podem ser potencialmente afetadas pela obesidade e também ser claramente regulada em adipócitos viscerais ou subcutâneos. No entanto, muito pouco se sabe sobre como a obesidade induzida pela

dieta afeta o conteúdo ou a atividade da HSL e ATGL, bem como a lipólise basal e induzida por catecolaminas em tecido adiposo branco visceral e subcutâneo.

Para avaliar os efeitos da dieta sobre os principais mecanismos moleculares que regulam a lipólise em TAB, Gaidhu et al., 2010 examinaram a fosforilação da HSL sobre resíduos chave de serina, bem como o teor de proteínas de ATGL e perilipina. Desde que a AMPK também tem sido implicada na regulação da atividade HSL, a fosforilação e conteúdo desta quinase e de seus substratos diretos foram determinados. A fosforilação da HSL em serina-563, -565, -660 revelou que estas variáveis foram potencialmente suprimidas no tecido adiposo visceral e subcutâneo de ratos tratados com dieta hiperlipídica, apesar de nenhuma mudança no conteúdo de proteína total da HSL.

A perilipina foi diminuída em ambos os depósitos de gordura de ratos dieta, embora este efeito tenha sido mais pronunciado no tecido adiposo visceral em comparação com o subcutâneo. Por outro lado, o conteúdo de ATGL foi significativamente aumentado em ambos os depósitos de gordura. Uma vez suprimida a fosforilação de HSL no TAB visceral e subcutâneo, eles analisaram o conteúdo de DAG e atividade da ATGL nestes depósitos de gordura de ratos controle e dieta. O conteúdo de DAG aumentou 2,5 vezes no depósito visceral e de 2,9 vezes em subcutâneo. A atividade da ATGL aumentou 1,4 e 2 vezes no visceral e subcutâneo de ratos dieta, respectivamente (GAIDHU et al., 2010).

Como esperado, os adipócitos de ratos controle expostos a adrenalina sofreram aumento da liberação de glicerol ($0,52 \pm 0,04$ a $14,16 \pm 0,44$ $\text{nmol} \cdot 75 \text{ min} \cdot 10^{-5}$ células e de $0,26 \pm 0,03$ - $10,49 \pm 1,12$ $\text{nmol} \cdot 75 \text{ min} \cdot 10^{-5}$ células em adipócitos viscerais e subcutâneo, respectivamente). Camundongos dieta apresentaram a lipólise basal aumentada nos adipócitos visceral e subcutâneo 2,3 e 2,9 vezes, respectivamente, enquanto a lipólise estimulada por adrenalina foi atenuada em ambos os depósitos de gordura de animais dieta (GAIDHU et al., 2010).

Das funções essencialmente da ATGL como lipase de TAG (ZIMMERMANN et al., 2004; SCHWEIGER, 2006), a suprarregulação de conteúdo da ATGL em combinação com o aumento da expressão de seu coativador CGI-58 deve ter promovido quebra de TAG e formação de DAG. Isto é suportado pelos dados indicando que a atividade da lipase TAG é aumentada em tecido adiposo branco de camundongos dieta. Por outro lado, a supressão induzida pela dieta da fosforilação/atividade da HSL, diminui a quebra de DAG, facilitando assim seu acúmulo no TAB. Isto é evidenciado pelos resultados que mostram que o conteúdo DAG foi significativamente aumentado em 2,5 e 2,9 vezes nos adipócitos visceral e subcutâneo, respectivamente. Este fato também corrobora com estudos anteriores em camundongos HSL - *knockout* mostrando que, na ausência desta lipase ocorre acúmulo de DAG em TAB (HAEMMERLE et al., 2002).

Além da fosforilação HSL, o conteúdo de perilipina também foi reduzido em ambos os depósitos de gordura de camundongos tratados com dieta. Em animais dieta os níveis de perilipinas em TAB foram dificilmente detectáveis, enquanto que em subcutâneo o conteúdo desta proteína foi menor do que o controle, embora ainda presentes em abundância. O conteúdo reduzido de perilipina tem sido demonstrada por alterar a quebra normal de lipídios neutros nas células adiposas (HAEMMERLE et al., 2002).

Na verdade, já havia sido relatado que a lipólise basal é elevada, ao passo que a lipólise estimulada por isoproterenol é severamente atenuada em camundongos perilipina nulos (TANSEY et al., 2001). Com base nessas observações, foi proposto que a perilipina exerce um papel importante para prevenir o acesso de lipases a estoques de lipídios neutros em condições basais, ao passo que sua presença é necessária para lipólise mediada por PKA (TANSEY et al., 2001; BRASAEMLE, 2007).

Na ausência de estímulo adrenérgico, HSL está localizada principalmente no citoplasma, enquanto que a perilipina está na superfície da gotícula lipídica (SZTALRYD et al., 2003). Após estímulos adrenérgicos, a ativação da PKA fosforila a HSL, bem como a perilipina (SU et al., 2003; MIYOSHI et al., 2007). HSL, em seguida, transloca para a gotícula lipídica e com perilipina leva a uma melhora na hidrólise de lipídios neutros (SU et al., 2003; SZTALRYD et al., 2003; WANG et al., 2009), indicando que a interação da perilipina e HSL é essencial para os efeitos mediados por PKA sobre a lipólise.

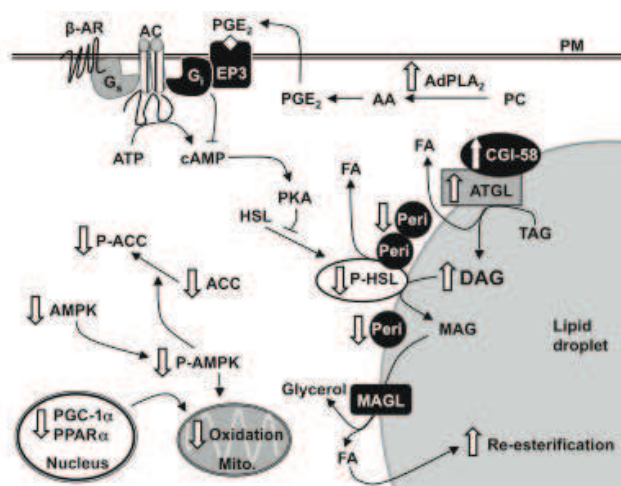


Figura 16: Resumo dos efeitos da HFD em lipólise dos adipócitos e metabolismo. Setas representam supra ou subregulação da atividade, conteúdo de proteína e / ou expressão. Linhas sem setas indicam inibição. Sob HFD, o efeito das catecolaminas na cascata de sinalização β -adrenérgica (β -AR) por meio da ativação reduzida do receptor de proteína G estimuladora acoplado (Gs). Isto reduz a ativação da proteína quinase A (PKA) e inibe a fosforilação da lipase hormônio-sensível (HSL). HFD também supreregula a expressão do tecido adiposo fosfolipase A₂ (AdPLA₂), que tem sido demonstrada pelo aumento da produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), o ligante primário para o E-3 prostanóides receptor (EP3). Uma vez EP3 acoplado a uma proteína G inibitória (Gi), a ativação desse receptor inibe ainda mais PKA em condições HFD. Aumento do conteúdo e identificação ATGL-58 gene comparativa (CGI-58). A expressão também ocorre com HFD para facilitar a quebra TAG, embora subsequente diminuição HSL fosforilação / atividade resulte no acúmulo de DAG. HFD induz a diminuição do conteúdo de perilipinas (Peri) também parece contribuir para a lipólise disfuncional nestas células. Redução do conteúdo/ fosforilação de AMPK por HFD está em linha com a oxidação e supressão da ACC. A capacidade oxidativa dos adipócitos é diminuída com HFD, que é compatível com a supressão dos reguladores da

biogênese mitocondrial, como peroxisoma proliferador-ativado receptor- γ (PPAR- γ) coativador-1 α (PGC-1 α) e expressão de PPAR- α . AC, a adenilato ciclase; AA, o ácido araquidônico; fosfatidilcolina PC,; PM, membrana plasmática; FA, ácidos graxos; MAG; monoacilglicerol; magl, MAG lipase; Mito, mitocôndrias. Adaptado de Gaidhu et al., 2010.

Em resumo, os resultados de Gaidhu et al. 2010 indicam que a obesidade induzida pela dieta perturba a sinalização através de componentes principais da cascata lipolítica no TA.

Especificamente, HSL e perilipina são subreguladas, enquanto ATGL e CGI-58 são suprarreguladas. Isso culmina no aumento basal da lipólise induzida por catecolaminas e acúmulo de DAG em depósitos viscerais e subcutâneos. Além disso, o comprometimento da atividade da AMPK e *down regulation* de PGC-1 e PPAR resultaram em elevada esterificação e reduzida capacidade para oxidar ácidos graxos nos adipócitos viscerais e subcutâneos.

Ao todo, estas alterações na regulação molecular da lipólise e o metabolismo de ácidos graxos sugerem adaptações metabólicas disfuncionais que ocorrem com a dieta hiperlipídica no tecido adiposo branco e pode ajudar ainda mais a nossa compreensão dos mecanismos defeituosos que contribuem para a obesidade e suas alterações metabólicas associadas.

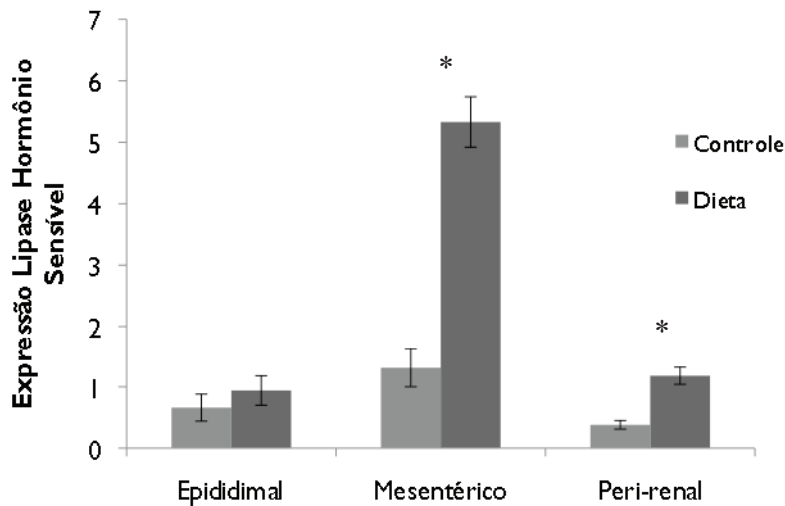


Figura 17: Expressão gênica da enzima *HSL* em tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $p < 0,05$ - teste *t* Student. $n = 6$.

4.2.2.2 LPL no tecido adiposo

LPL é um marcador importante para a diferenciação dos adipócitos, e a expressão da LPL aumenta em paralelo com o acúmulo de TAG celular como pré-adipócitos diferenciados. Embora o tecido adiposo possa sintetizar os novos ácidos graxos livres, os ácidos graxos livres para o armazenamento de lipídios são preferencialmente fornecidos pela hidrólise mediada por LPL de lipoproteínas plasmáticas ricas em TAG. LPL é, portanto, considerada uma enzima chave por desempenhar um papel importante na iniciação e/ou desenvolvimento da obesidade (WANG & ECKEL, 2009).

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa na expressão gênica da LPL nos depósitos adiposos epididimal e mesentérico havendo uma diminuição na expressão de LPL no depósito adiposo peri-renal (Figura 18).

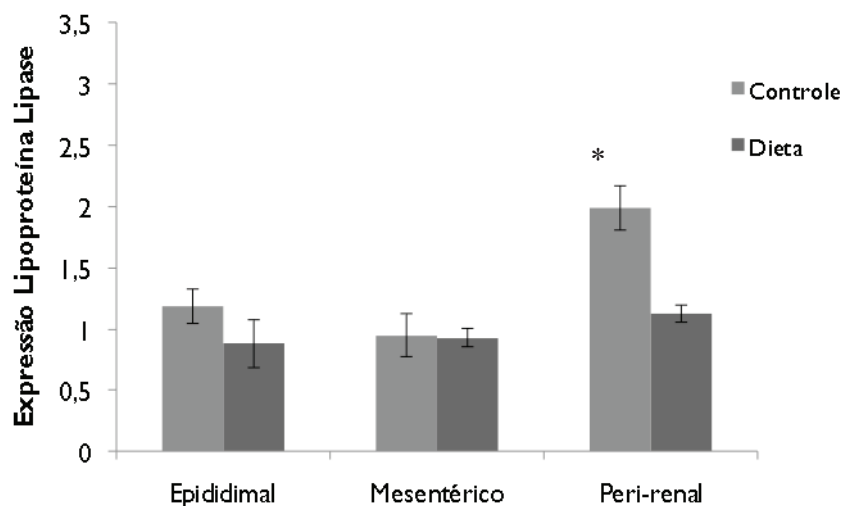


Figura 18: Expressão gênica da enzima *LPL* em tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $p < 0,05$ peri-renal dieta vs peri-renal controle - teste *t* Student. $n = 6$.

Numerosos estudos têm revelado que dietas ricas em gordura promovem a hiperglicemia e a resistência à insulina (RI). É geralmente aceito que dietas ricas em gordura podem ser usados para gerar um modelo de roedores válido para a síndrome metabólica com RI (BUETTNER et al., 2006). O tratamento dos animais com dieta contendo alto teor de gordura (mais de 50% das calorias) por aproximadamente cinco semanas é suficiente para iniciar a obesidade moderada e muitas vezes resultam em RI (MOLLER & KAUFMAN, 2005; FAM et al., 2006).

Em EU, et al., 2010, foi proposto estudar os efeitos do ácido Glicirrízico (AG) em ratos alimentados com uma dieta rica em gorduras com 60% de calorias provenientes de gordura vegetal por quatro semanas. Para tal foram estabelecidos três grupos sendo: controle, alimentados com dieta sem tratamento com AG e alimentados com dieta tratados com AG. Os animais que ingeriram dieta e não receberam o tratamento com AG apresentaram, em relação ao controle,

subexpressão da LPL em tecido cardíaco, muscular esquelético, adiposo visceral e subcutâneo, porém, o oposto foi verificado no hepático. Foi constatado também hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hiperglicemia nos animais dieta com tendência a um aumento, porém, sem diferença significativa, na concentração de colesterol plasmático. Aplicando o índice HOMA-IR verificou-se resistência a insulina. Por fim verificaram um aumento na deposição de gordura nos tecidos estudados com aumento significativo no tecido hepático.

No estado resistente à insulina, a diminuição da supressão da lipólise mediada pela insulina em adipócitos promove a liberação de ácidos graxos, que inibe a atividade da LPL (FRANSSEN et al., 2008). Quando a oferta de ácidos graxos excede a demanda do tecido, ácidos graxos provavelmente se ligam a LPL e deslocando-a de seus sítios de ligação, assim, tornando-as não-funcionais (PULNILKUNNIL & RODRIGUES, 2006).

A *down regulation* da LPL no tecido adiposo, músculos e rim neste estudo, segundo o autor, pode ser devido a mediadores inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) que são encontrados por estarem elevados nos estados de obesidade e resistência à insulina. A inibição da transcrição gênica da LPL é sugerida por ser mediada, em parte, através do bloqueio de interações do fator nuclear-Y/CCAAT com o promotor da LPL (PREISS-LANDI et al., 2002; ROSEN & SPIEGELMAN, 2006). No entanto, o aumento do nível de TNF- α leva a um efeito oposto no fígado. De acordo com Wang e Eckel, 2009, a LPL não é normalmente expressa no fígado adulto de animais, mas pode ser expresso sob condições específicas fisiológicas e patológicas. Uma única dose de TNF- α pode causar um aumento significativo nos níveis de mRNA de LPL no fígado.

No entanto, o mecanismo detalhado de tal indução não é bem compreendido. O aumento na atividade da LPL hepática e sua concomitante diminuição nos tecidos não-hepáticos poderia ter resultado em uma maior divisão do TAG plasmático para o fígado e captação hepática

aumentada de AGL. Isso levaria a um aumento na secreção de VLDL-TAG e apolipoproteína B100 (apoB100) a partir do fígado (ADIELS et al., 2008) e, portanto, pode contar para a hipertrigliceridemia observada no grupo dieta quando comparado ao grupo controle.

A obesidade induzida por RI resulta em desregulação profunda na homeostase da glicose, e produz elevações nos níveis de glicemia de jejum e pós-prandial (SALTIEL & KAHN, 2001). Ainda em EU, et al., 2010, a concentração de glicose no sangue foi significativamente aumentada no grupo dieta quando comparado ao grupo controle. Com o desenvolvimento da obesidade visceral, a alta circulação AGL leva a RI que promove um duplo efeito para aumentar a hiperglicemia por (i) *down regulation* do transportador de glicose insulino-dependente 4 (GLUT4), através do ciclo de Randle e portanto, promove um acúmulo de glicose na circulação e (ii) estímulo da gliconeogênese hepática, antagonizando a ação da insulina no fígado (RI hepática) (LANN & LEROITH, 2007).

Sendo assim estes dados vem de encontro com nossos resultados que demonstraram uma diminuição na expressão de LPL no tecido adiposo e um aumento da mesma no tecido hepático sugerindo então que o tratamento com dieta hiperlipídica altera o metabolismo lipídico e glicídico.

4.2.2.3 PDK 4 e PDP2 no tecido adiposo

Nossos resultados não apresentaram alterações significativas na expressão gênica de PDK4 nos depósitos adiposos epididimal e mesentérico, porém no peri-renal foi observado aumento significativo na expressão da mesma (Figura 19). Já em relação a expressão da PDP2 não houve alterações significativas em nenhum dos depósitos em questão (Figura 19).

Como já apresentado anteriormente, a PDK 4 é uma das isoformas da porção quinase do complexo piruvato desidrogenase mitocondrial (CPD) que catalisa a descarboxilação irreversível

do piruvato a acetil-CoA e CO₂. Este complexo regula o equilíbrio entre a oxidação de glicose e lipídios, dependendo do estado nutricional e, portanto, desempenha papel de chave metabólica para seleção de combustível (SUGDEN et al., 2001). A atividade deste complexo é rigidamente controlada a curto prazo por um ciclo de fosforilação/ desfosforilação contínuo. A fosforilação da subunidade E1 do CPD é catalisada pelas quinases (PDKs), que inativam CPD, enquanto que as fosfatases (PDPs) ativam CPD através da desfosforilação. Quatro isoformas da PDK (PDK1-4) e duas isoformas da PDP (PDP1 e -2) têm sido descritas em mamíferos e são expressas em quantidades variadas de forma tecido-específicas (BOWKER-KINLEY et al., 1998; SUGDEN & HOLNESS, 2003).

Sabe-se que a resistência à insulina está associada a alterações no equilíbrio entre as vias oxidativas da glicose e dos ácidos graxos. Isto leva a hiperglicemia crônica por causa de produção excessiva de glicose hepática (gliconeogênese) (BODEN et al., 2001) associada a uma diminuição na disponibilidade de glicose induzida pela insulina no interior do tecidos periféricos, tal como o músculo esquelético (KELLEY et al., 1992). Além disso, a resistência à insulina está associada com uma concentração plasmática excessiva de ácidos graxos não esterificados (AGNE), que é em parte devido à redução do efeito antilipolítico da insulina sobre tecido adiposo branco (TAB) em situação pós-prandial e uma diminuição da reesterificação de ácidos graxos durante lipólise no jejum (GELDING et al., 1995; ERIKSSON et al., 1999). Inúmeras linhas de evidências apóiam a noção de que esse aumento de AGNE no plasma desempenha papel fundamental no aparecimento precoce de resistência à insulina (PAOLISSO et al., 1995; CHARLES et al., 1997; BERGMAN & ADER, 2000).

Para evitar hiperglicemia em estados insulino-resistentes, inibidores da PDK têm sido desenvolvidos para ativar CPD, diminuindo assim a gliconeogênese no fígado e aumento das capacidades de glicólise oxidativa no músculo esquelético (MORRELL et al., 2003; MAYERS et

al., 2003). No entanto, o papel do CPD e de sua regulamentação pela relação PDK/PDP em outros tecidos sensíveis à insulina, como tecido adiposo, não tem sido extensivamente estudada.

Em TAB, vias lipolíticas e de reesterificação estão ativas e ambas participam do controle da liberação de AGNE (VAUGHAN, 1962). O processo de reesterificação em triglicérides de uma parte importante do AGNE decorrentes da lipólise requer a síntese de glicerol-3-fosfato (G3P), que resulta principalmente de substratos não carboidratos, como lactato ou piruvato através de uma via chamada gliceroneogênese (RESHEF et al., 1967; RESHEF et al., 1970). A enzima chave desta via metabólica é a isoforma citosólica da PEPCK-C (BALLARD et al., 1967).

O piruvato pode ser carboxilado a oxaloacetato pela piruvato carboxilase e usado para gliceroneogênese ou descarboxilado a acetil-CoA pelo CPD para o ciclo do ácido tricarboxílico. Por isso, hipotetizamos que o fluxo do piruvato através da gliceroneogênese foi negativamente relacionado com a atividade CPD. Como sequenciaconsequencia, a relação PDK/ PDP iria participar na via de reesterificação de ácidos graxos nos adipócitos.

Estudos anteriores mostraram que PEPCK-C nos adipócitos e toda via gliceroneogênica são alvos específicos para os agonistas de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR) gama, como as tiazolidinedionas (rosiglitazona), em roedores e humanos (TORDJMAN et al., 2003; LEROYER et al., 2006; CADOU DAL et al., 2007). A Rosiglitazona (RSG), desenvolvido para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2, é conhecida por ter efeitos poderosos sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios levando à melhoria da sensibilidade à insulina nos tecidos-alvo (LE BOUTER et al., 2010). Pck1, que codifica PEPCK-C, é o gene mais precocemente e fortemente ativado por rosiglitazona nos adipócitos, sugerindo um papel essencial da PEPCK-C na resposta do TAB para tiazolidinedionas. Tal aumento no PEPCK-C precede a ativação da gliceroneogênese, que participa do sequestro de lipídios no tecido adiposo

observado com estes compostos e, assim, explicam, pelo menos em parte, as propriedades hipolipemiantes desta classe de drogas (YE et al., 2004).

Cadoudal et al. (2008) estudaram a regulação por tiazolidinedionas da expressão de PDK2 e PDK4, as duas isoformas de PDK expressa nos tecidos adiposo tecido em ratos e mostraram que o tratamento com Rosiglitazona por 4 dias, aumentou a expressão de PDK4 em tecido adiposo subcutâneo, peri-epididimal e retroperitoneal, mas não no fígado e no músculo. A transcrição de PDK2 e das fosfatase PDP1 e PDP2 não foi afetada. Esta seletividade por esta isoforma também foi encontrada em ex vivo tratados com explantes. Em adipócitos da linhagem celular 3T3-F442A, a expressão de Pdk4 foi fortemente e seletivamente induzida pela rosiglitazona. O uso de ácido dicloroacético ou leelamine, dois inibidores da PDK, ou uma siRNA PDK4 específico, demonstrou que PDK4 participou da gliceroneogênese, portanto alterando a liberação de ácidos graxos livres em condições basal e induzida por rosiglitazona.

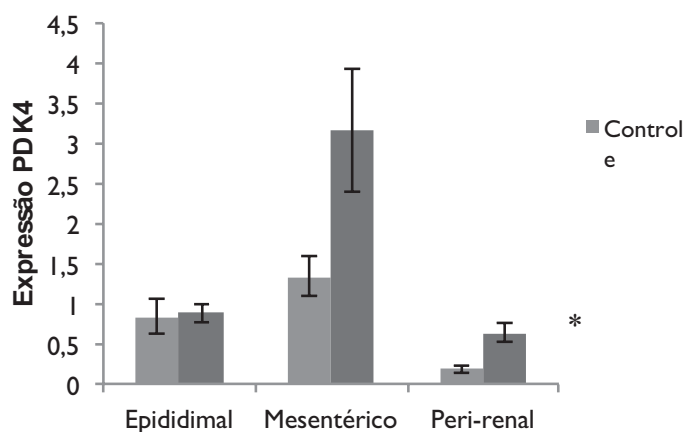


Figura 19: Expressão gênica da enzima *PDK4* em tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $p < 0,05$ - teste *t* Student. $n = 6$.

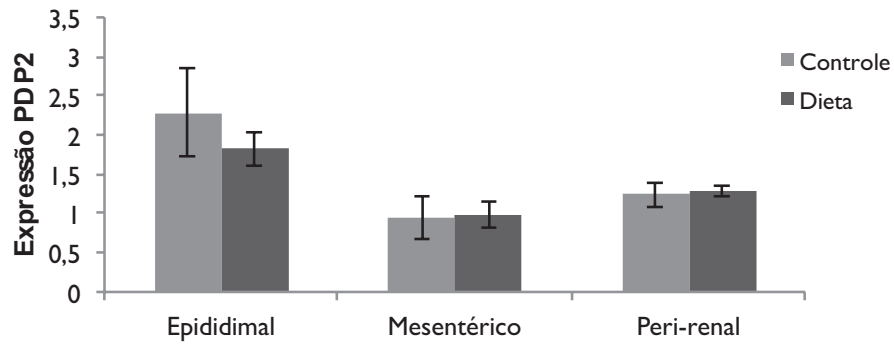


Figura 20: Expressão gênica da enzima *PDP2* em tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). * $p < 0,05$ - teste *t* Student. $n = 6$.

4.2.2.4 *Acaca* no tecido adiposo

Na análise da *Acaca* (Figura 21) não houve alterações significativas em nenhum dos depósitos em questão, sugerindo que a expressão desta enzima nos adipócitos das diferentes regiões epididimais está preservada.

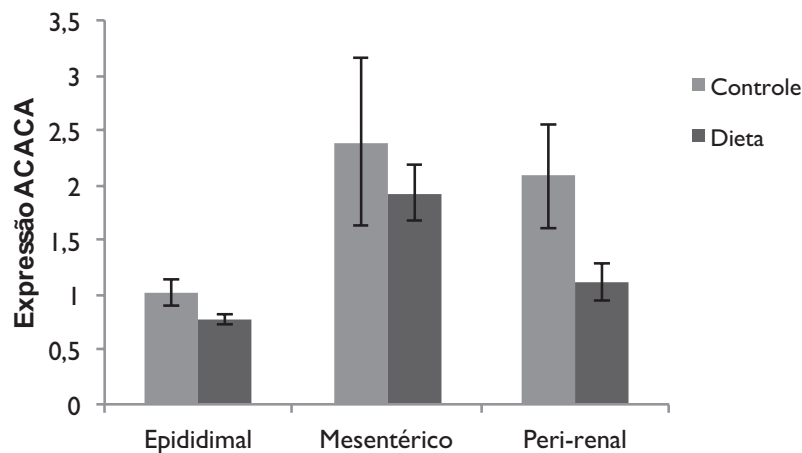


Figura 21: Expressão gênica da enzima *Acaca* em tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e peri-renal, isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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). n = 6.

O evento central no metabolismo lipídico é a geração de malonil-CoA via carboxilação do acetil-CoA pela acetil-CoA carboxilases alpha e beta (*Acaca* e *Acacb*). No fígado, malonil-CoA gerado pelo *Acaca* é utilizado para síntese e alongamento de ácidos graxos (AG), finalmente levando à formação de triglicérides. No coração e no músculo esquelético, com uma capacidade limitada para a síntese de AG, malonil-CoA formada na superfície mitocondrial por *Acacb* funciona basicamente como um regulador negativo da oxidação de AG através da inibição da carnitina palmitoiltransferase (CPT-I) (McGARRY & BROWN, 1997; RUDERMAN et al., 1999; McGARRY, 2001; HARWOOD, 2005).

Em humanos e animais, Acaca e Acacb são codificadas por genes separados (WIDMER et al., 1996; KIM, 1997). A quota de enzimas humanas apresentam 75% de identidade na sequencia geral de aminoácidos, com exceção de uma extensão extra sequencia N-terminal da Acacb, o que não está presente em Acaca. A extensão N-terminal da Acacb é relatado por dirigir a proteína para a membrana mitocondrial (ABU-ELHEIGA, 2000; ABU-ELHEIGA, 2003; ABU-ELHEIGA, 2003). Acaca, sem essa sequencia fica localizada na citosol (ABU-ELHEIGA, 2000). A atividade da ACC é regulada em resposta à dieta, alterações hormonais e outras mudanças fisiológicas. A regulação não procede apenas via mecanismos regulatórios a curto prazo como a ativação alostérica pelo citrato, a inibição por feedback pelos AGs de cadeia longa, fosforilação e inativação reversível, mas também através de modulação da produção de proteínas através da alteração da expressão do gene (KIM, 1997; HARWOOD, 2005; BROWNSEY et al., 2006).

Devido ao seu importante papel no metabolismo lipídico, Acaca e Acacb estão sendo atualmente discutidos como alvos atraentes para tratar a obesidade, diabetes e síndrome metabólica (HARWOOD, 2005; WAKIL & ABU-ELHEIGA, 2009). A desregulação dos níveis intracelulares de malonil-CoA e associação da detecção do combustível e redes de sinalização são sugeridas por estarem envolvidos na resistência à insulina e diabetes (PRENTI & CORKEY, 1996; RUDERMAN et al., 1999; RUDERMAN & PRENTKI, 2004; SAGGERSON, 2008). Estudos correlacionando a diminuição da atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e aumento nas concentrações de malonil-CoA têm sido amplamente analisados (RUDERMAN & PRENTKI, 2004). No entanto, concentrações aumentadas de malonil-CoA também pode ser resultado de alterações primárias em na expressão de Acaca e / ou Acacb.

Kreuz et al., 2009, ao comparar os níveis de expressão da Acaca e Acacb em ratos Zucker magros de 8 e 15 semanas de idade (ZLC), observaram mudanças transcricionais que se manifestaram em redução da Acaca no tecido adiposo e no fígado e redução nas concentrações de

Acacb no fígado de animais mais velhos. Mudanças semelhantes também foram encontradas em ratos Zucker obesos (ZF) e Zucker diabéticos e obesos (ZDF). De acordo com este, Nogalska et al., 2005 demonstraram, anteriormente para o tecido adiposo branco, que o envelhecimento está associado com uma redução significativa na expressão dos genes lipogênicos como SREBP-1c, ácidos graxos sintase e Acaca.

Além dessas mudanças relacionadas à idade, também observaram diferenças entre ZF e ratos ZDF, em comparação com ratos controle pareados por idade ZLC, indicando efeitos relacionados com a obesidade ou diabetes sobre os níveis de transcrição da ACC. Em tecidos oxidativo de ratos ZDF, o mRNA de Acacb foi elevado e o mRNA de Acaca foi reduzido em comparação com os animais ZLC. Em linha com esta observação, a oxidação reduzida de AG no músculo sóleo de ZDF oito semanas de idade em comparação com animais magros foi publicado (IDE et al., 2000).

Em animais ZF, os níveis de transcrição de Acacb foram elevados no músculo sóleo e coração, mas as mudanças foram menos pronunciadas do que em animais ZDF, o que poderia apontar para mudanças mais brandas na oxidação muscular de AG em animais ZF. Em tecidos lipogênicos, alterações nos níveis de transcrição da ACC foram diferentes entre fígado e depósito adiposo. Em ZDF e ratos ZF, os níveis de mRNA Acaca e Acacb foram aumentados no fígado em comparação com animais controle, embora a significância só tenha sido alcançada em idades mais jovens. Essas mudanças poderiam, potencialmente, contribuir para a síntese de triglicerídeos aumentados e reduzidas taxas de oxidação de AG, um cenário que é apoiado por diversos estudos descrevendo aumento do teor de triglicerídeos no fígado de animais ZDF (IDE et al., 2000; LEONARD et al., 2005; SERKOVA et al., 2006).

Em contraste com o fígado, ambos os depósitos de tecido adiposo (subcutâneo, visceral) revelaram quantidades muito reduzidas de mRNA Acaca em ratos ZDF, enquanto que em

animais ZF aumento nos níveis de Acaca foram medidos em gordura subcutânea. Isso indica uma redução na síntese e armazenamento de gordura no depósito adiposo de ratos ZDF e um aumento na síntese de gordura e de armazenamento nos animais ZF.

Estudamos os diferentes panículos adiposos (epididmal, mesentérico e peri-renal) por estes apresentarem diferenças fisiológicas. Interessantemente observamos alterações mais significativas no panículo peri-renal que não apresentam na literatura muitos estudos metabólicos. Sendo assim, observamos no peri-renal aumento no panículo adiposo com 6 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, e com 4 semanas verificamos aumento na expressão gênica das enzimas HSL e PDK4, com uma diminuição da expressão gênica de LPL e sem alterações significativas em Acaca e PDP2. Estes dados indicam aumento na atividade lipolítica e redução da atividade lipogênica mas o adipócito desta região não apresenta alteração nos dados morfométricos mostrando que não sofre alteração em seu tamanho em relação ao adipócito controle. O que estaria mantendo então o tamanho do adipócito?

O que nos parece uma boa hipótese é que a glicose estaria entrando nesta célula, lembrando que esta apresenta uma menor sensibilidade a insulina, via GLUT2 e como nesta célula glicose não pode ser convertida a glicogênio seus possíveis destinos seriam: via glicolítica configurando-se como substrato energético, conversão a lactato ou síntese de TAG. Se a glicose estivesse sendo utilizada como substrato energético ou convertida a lactato o tamanho do adipócito não se manteria, o que nos leva a acreditar que no tecido adiposo a glicose captada estaria sendo armazenada sob a forma de TAG (Figura 22).

No epididimal, se HSL e LPL não apresentam diferença significativa assim como PDK4 e Acaca o que estaria mantendo o tamanho do adipócito considerando que esta célula com 6 semanas apresenta lipólise basal diminuída?

Dieta Hiperlipídica 4 semanas				
Adipócito	Panículo	Lipólise Basal	Expressão Gênica Enzimática	Resultado
Peri-Renal	↑	---	HSL ↑ LPL ↓ PDK4 ↑ Acaca s/ ≠	Glicose da dieta ↓ TAG
Epididimal	↑	↓	HSL LPL PDK4 Acaca } s/ ≠	Quem mantém o tamanho do adipócito?
Mesentérico	---	---		

Figura 22: Esquema resumido das alterações apresentadas na expressão gênica das enzimas em tecido adiposo isolado de ratos controle e que ingeriram dieta hiperlipídica ao longo de 4 semanas. Os ratos controle ingeriram ração padrão para laboratório contendo 4% de gordura e 0% de colesterol; Nuvilab, Brasil e a ração hiperlipídica 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).

5. CONCLUSÕES

- Quatro semanas de administração de dieta hiperlipídica a ratos induz:
 - esteatose hepática, com aumento significativo na expressão de lipoproteína lipase, PDK4 e PFK1, diminuição significativa na expressão da enzima G6PC e sem alterações expressão das enzimas ACACA, GyK e PDP2, indicando alterações predominantes no metabolismo lipídico sem portanto alterações relevantes no metabolismo glicídico;
 - Aumento na expressão da enzima lipase hormônio sensível no tecido adiposo das regiões mesentérica e peri-renal, aumento este que foi acompanhado de diminuição na expressão da enzima LPL no tecido adiposo peri-renal. Estas alterações não causaram mudanças significativas na morfometria (área ou diâmetro) dos adipócitos isolados destas regiões. Como a ausência de alteração na expressão de LPL não explica os motivos da ausência de diminuição dos adipócitos podemos inferir que a reposição dos estoques pode estar acontecendo devido ao aumento da entrada de glicose neste tecido, que pode ser fonte para a TAGs impedindo assim de causar diminuição no tamanho do adipócito.
- Estes resultados em conjunto indicam que a dieta administrada por 4 semanas pode ser útil para os estudos iniciais do quadro de dislipidemia que antecedem as disfunções metabólicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-ELHEIGA, L. et al. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 1444 – 1449, 2000.
- ABU-ELHEIGA, L.; MATZUK, M.M.; ABO-HASHEMA, K.A.; WAKIL, S.J. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science*, 291: 2613–2616, 2001.
- ABU-ELHEIGA, L.; OH W.; KORDARI, P.; WAKIL, S.J. Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 10 207 – 10 212, 2003.
- ADIELS, M.; OLOFSSON, S.O.; TASKINEN, M.R.; BOREN, J. Overproduction of very lowdensity lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28:1225-1236, 2008.
- AINSLIE, D.A.; PROIETTO, J., FAM, B.C., THORBURN, A.W. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* , 71: 438-442, 2000.
- AL-DAMLUJI, S. Adrenergic mechanisms in the control of corticotrophin secretion. *J. Endocrinol.*, 119 (1): 5-14, 1988.
- ANTHONSEN, M.W.; RONNSTRAND, L.; WERNSTED C.; DEGERMAN, E.; HOLJ, C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem*, 273: 215–221, 1998.
- ARAKI, M.; MOTOJIMA, K. Identification of ERRalpha as a specific partner of PGC-1alpha for the activation of PDK4 gene expression in muscle. *FEBS J.* 273, 1669 – 1680, 2006.
- ARNER, P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19: 471–482, 2005.

- ATEF, N.; LAFONTAN, M.; DOUBLE, A.; HELARY, C.; KTORZA, A.; PENICAUD, L. A specific beta 3-adrenoceptor agonist induces increased pancreatic islet blood flow and insulin secretion in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 298 (3): 287-292, 1996.
- BALLARD, F.J.; HANSON, R.W.; LEVEILLE, G.A. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J Biol Chem*, 242:2746 –2750, 1967.
- BARRE, H.; GÉLOEN, A.; CHATONNET, J.; DITTMAR, A.; ROUANET, J. L. Potentiate muscular thermogenesis in the cold-acclimated muscovy duckling. *Am. J. Physiol.*, 249: R533-R538, 1985.
- BARRE, H. et al. Effects of glucagons on birds thermogenesis. In: Endocrine regulations as adaptative mechanisms to the enviroment. Assenmacher I. *Et Boissin J.* (Edits) CNRS, Paris, 395-401, 1986.
- BAYS, H.E. ; GONZALES-CAMPOY, J.M. ; BRAY G.A ; KITABCHI A.E. ; BERGMAN, D.A. ; SCHORR, A.B.; RODBARD, H.W.; HENRY, R.R. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 6: 343–368, 2008.
- BERGMAN, R.N.; ADER, M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*, 11:351–356, 2000.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N. *Fisiologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1034 p.
- BERNSTEIN, R.M.; DAVIS, B.M.; OLEFSKY, J.M.; REAVEN, G.M. Hepatic insulin responsiveness in patients with endogenous hypertriglyceridaemia. *Diabetologia*, 14:149-253, 1978.
- BERNSTEIN, R.S.; ZIMMERMANZ, K.S.; CARNEY, A.L. Absence of Impaired Glucose Utilization in Adipocytes from Rats Fed a Carbohydrate-Free, High Protein Diet. *J. Nutr*, 111: 237-243, 1981.
- BJORNTORP, P.; KARLSSON, M.; PETERSON, P. Expansion of adipose tissue storage capacity in different ages in rat. *Metabolism*, 31: 366-373, 1982.

- BODEN G.; CHEN, X.; STEIN, T. P. Gluconeogenesis in moderately and severely hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 280:E23–E30, 2001.
- BODEN, G. Fatty acids and insulin resistance. *Diabetes Care*, 19 (4): 394-395, 1996.
- BOLINDER, J.; KAGER, L.; OSTMAN, J.; ARNER, P. Differences at the receptor and postreceptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. *Diabetes*, 32: 117–123, 1983.
- BONORA, E.; KIECHL, S.; WILLEIT, J.; OBERHOLLENZER, F.; EGGER, G.; TARGHER, G.; ALBERICH, M.; BONADONNA, R.C.; MUGGEO, M. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders – The Bruneck study. *Diabetes*, 47: 1643- 1649, 1998.
- BOWKER-KINLEY, M.M.; DAVIS, W.I.; WU, P.; HARRIS, R.A.; POPOV, K.M. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J*, 329:191–196, 1998.
- BRASAEMLE, D.L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*, 48: 2547–2559, 2007.
- BROWN, M.R.; FISHER, L.A. Brain peptide regulation of adrenal epinephrine secretion. *Am. J. Physiol.*, 247 (1, pt 1): E41-E46, 1984.
- BROWN, M.R. Corticotrophin-releasing factor: effects on the autonomic nervous system and visceral systems. *Fed. Proc.*, 44: 234-248, 1985.
- BROWN, J.D.; OLIGONO, E.; RADER, D.J.; SAGHATELIAN A.; PLUTZKY, J. VLDL Hydrolysis by Hepatic Lipase Regulates PPAR δ Transcriptional Responses. *PLoS ONE* , 6: 7, 2011.
- BROWNSEY, R.W.; BOONE, A.N.; ELLIOTT, J.E. et al. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*, 34: 223 – 227, 2006.

- BRUMMELEN, P. The relevance of intrinsic sympathomimetic activity for beta-blocker-induced changes in plasma lipids. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 5(1), S51-5, 1983.
- BUETTNER, R.; PARHOFER, K.G.; WOENCKHAUS, M.; WREDE, C.E.; KUNZ-SCHUGHART, L.A. Defining high-fat diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*, 36:485-501, 2006.
- CADOUDAL, T.; BLOUIN, J.M.; COLLINET, M.; FOUQUE, F.; TAN, G.D.; LOIZON, E.; BEALE, E.G.; FRAYN, K.N.; KARPE, F.; VIDAL, H.; BENELLI, C.; FOREST, C. Acute and selective regulation of glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in adipose tissue by thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50:666–675, 2007.
- CADOUDAL, T.; DISTEL, E.; DURANT, S.; FOUQUE, F.; BLOUIN, J.M.; COLLINET, M.; BORTOLI, S.; FOREST, C.; BENELLI, C. Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4: Regulation by Thiazolidinediones and Implication in Glyceroneogenesis in Adipose Tissue. *Diabetes*, 57(9): 2272–2279, 2008.
- CARBREY, J.M. ; GORELICK-FELDMAN, D.A. ; KOZONO, D. ; PRAETORIUS, J. ; NIELSEN, S. Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 2945-50, 2003.
- CARLSON, N. R. O comportamento alimentar: comer. In: Fisiologia do comportamento. 7 ed. São Paulo: Manole, p. 392-422, 2002.
- CASTAN, I. Antilipolytic effects of alpha2 –adrenergic agonists, neuropeptide y, adenosine and PGF1 in mammal adipocytes. *Am. J. Physiol*, 266: R1141-1147, 1994.
- CATALÁN, V.; GOMEZ-AMBROSI, J.; PASTOR, C., et al. Influence of morbid obesity and insulin resistance on gene expression levels of AQP7 in visceral adipose tissue and AQP9 in liver. *Obes Surg*, 18:695-701, 2008.

- CATTAL, G.B.P.; ROCHA, F.A.; HINTZE, L.J.; PAGAN, B.G.M.; NARDO-JUNIOR, N. Multiprofessional treatment program of the obesity: the challenges of the practice. *Cienc Cuid Saúde*, 7:(1), 121-126, 2008.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Metabolismo no estado absortivo. In: *Bioquímica ilustrada*. 2 ed, Porto Alegre: Artmed, 292, 2002.
- CHARLES, M.A.; Eschwege E, Thibult N, Claude JR, Warnet JM, Rosselin GE, Girard J, Balkau B24. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study. *Diabetologia*, 40:1101–1106, 1997.
- CHIU, H.K.; QIAN, K.; OGIMOTO, K.; MORTON, G.J.; WISSE, B.E., et al. Mice lacking hepatic lipase are lean and protected against diet-induced obesity and hepatic steatosis. *Endocrinology*, 151: 993–1001, 2010.
- CHOI, C.S.; KIM, Y. B.; LEE, F. N.; ZABOLOTNY, J. M.; KAHN, B. B.; YOUN, J. H. Lactate induces insulin resistance in skeletal muscle by suppressing glycolysis and impairing insulin signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E233-E240, 2002.
- CLARK, A.S.; MITCH, W. E.; GOODMAN, M. N.; FAGAN, J. M.; GOHEER, M. A.; CURNOW, R. T. Dichloroacetate inhibits glycolysis and augments insulin-stimulated glycogen synthesis in rat muscle. *J. Clin. Invest.* 79: 588-594, 1987.
- CRANDALL, D.L., LAI, F.M., HUGGINS, F.J., TANIKELLA, T.K., CERVONI, P. Effects of caloric restriction on cardiac reactivity and β -adrenoceptor concentration. *Am. J. Physiol.*, 244 (Heart Circ. Physiol. 13): H444-H448, 1983, 1983.
- CREGE, D.R.X.O. Captação periférica de glicose em ratos normo ou hiperlipidêmicos. Tese de doutorado defendida. Instituto de Biologia. Unicamp, 2012.

- DANEV, S., NIKOLOVA, R., KEREKOVSKA, M., SVETOSLAVOV, S. Relationship between heart rate variability and hypercholesterolaemia. *Cent. Eur. Publ. Hlth.*, 5 (3): 143-146, 1997.
- DEFRONZO, R.A. The triumvirate: B-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*. 37: 667-687, 1987.
- DEFRONZO, R.A., FERRANNINI, E. Insulin resistance – A multifactorial syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14 (3): 173-194, 1991.
- DEPRE, C.; VEITCH, K.; HUE, L. Role of fructose 2,6-biphosphate in control of glycolysis. Stimulation of glycogen synthesis by lactate in isolated working rat heart. *Acta. Cardiol.* 48: 147-164, 1993.
- DEPRE, C.; PONCHAUT, S.; DEPREZ, J.; MAISIN, L.; HUE, L. Cyclic AMP suppress the inhibition of glycolysis by alternative oxidizable substrates in the heart. *J. Clin. Invest.* 101: 390-397, 1998.
- DIAS, J. C. R.; CAMPOS, J. A. D. B. Aspectos epidemiológicos da obesidade e sua relação com o Diabetes mellitus. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, 33(1), 103-115, 2008.
- DIGIROLAMO, M., NEWBY, F.D. AND HILL, J. Blood lactate levels in human obesity. *Int. J. Obesity*, 13: 394, 1989.
- DIGIROLAMO, M.; NEWBY, F. D.; LOVEJOY, J. Lactate production in adipose tissue – a regulated function with extra-adipose implications. *Faseb Journal [S.I.]*, 6: (7), 2405-2412, 1992.
- DOAR, J.W. H.; WYNN, V.; CRAMP, D. G. Blood pyruvate and plasma glucose levels during oral and intravenous glucose tolerance tests in obese and nonobese women. *Metabolism*, 17: 690- 701, 1968.
- DOAR, J.W.H., WYNN, V.; CRAMP, D. G. The effect of obesity and maturity-onset diabetes mellitus on I⁹⁺) lactic acid metabolism. *Clin. Scin.*, 39: 271-279, 1970.

- ECKEL, R.H. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med.*, 320: 1060-1068, 1989.
- ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMET, P.Z. The metabolic syndrome. *Lancet*, 365: 1415-28, 2005.
- ERIKSSON, J.W.; SMITH, U.; WAAGSTEIN, F.; WYSOCKI, M.; JANSSON, P.A. Glucose turnover and adipose tissue lipolysis are insulin-resistant in healthy relatives of type 2 diabetes patients: is cellular insulin resistance a secondary phenomenon? *Diabetes*, 48:1572–1578, 1999.
- EU, C.H.A.; LIM, W.Y.A.; TON, S.H.; KADIR, K.A. Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*, 9:81, 2010.
- EXTON, J.H.; FRIEDMANN, N.; WONG, E.H.; BRINEAUX, J.P.; CORBIN, J.D.; PARK, C.R. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, 247 (11): 3579-3588, 1972.
- FAINTRENIE, G.; GÉLOËN, A. Alpha-1 adrenergic regulation of lactate production by white adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277(1): 235-238, 1996.
- FAINTRENIE, G.; GÉLOËN, A. Alpha-1 adrenergic stimulation uptake in white adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 286: 607-610, 1998.
- FAM, B.C., MORRIS, M.J.; HANSEN, M.J.; KEBEDE, M.; ANDRIKOPOULOS, S.; PROIETTO, J.; THORBURN, A.W. Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. *Diabetes Obes Metab*, 9:840-852, 2006.
- FARESE, R.V. JR.; YOST, T.J.; ECKEL, R.H. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal weight humans. *Metabolism*, 40(2): 214-216, 1991.

- FARIAS-SILVA, E.; GRASSI-KASSISSE, D. M., WOLF-NUNES, V. & SPADARI-BRATFISCH, R. C. Stress-induced alteration in the lipolytic response to beta-adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *J. Lip. Res*, 40(9):1719-1727, 1999.
- FARIAS-SILVA E., SAMPAIO-BARROS M.M., AMARAL M.E., CARNEIRO E.M., BOSCHERO A.C., GRASSI-KASSISSE D.M., SPADARI-BRATFISCH, R.C. Subsensitivity to insulin in adipocytes from rats submitted to foot-shock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 80 (8), 783-789, 2002.
- FARIAS-SILVA E, SANTOS IN, AMARAL MEC, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI BRATFISCH RC. Glucocorticoid receptor and beta-adrenoceptor expression in epididymal adipose tissue from stressed rats. *Ann N Y Acad Sci*, 1018: 328-332, 2004.
- FEDERSPIL, G.; ZACCARIA, M.; PEDRAAZZOLI, S.; ZAGO, E.; DEPALO, C.; SANDELLARI, C. Effects of sodium BL-Lactate on insulin secretion in anesthetized dogs. *Diabetes*, 29: 33-36, 1980.
- FOUFELLE, F.; GIRARD, J.; FERRE, P. Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms. *Advan. Enzyme Regul*, 36: 199-226, 1996.
- FRANSEN, R., MONAJEMI, H.; STROES, E.R.G; KASTELEIN, J.J.P. Obesity and Dyslipidaemia. *Endocrinol Metab Clin North AM*, 37:623-633, 2008.
- FRAYN, K.N, KARPE, F.; FIELDING, B.A.; MACDONALD, I.A.; COPPACK, S.W. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27: 875-888, 2003.
- FRIEDMAN, M. I.; RAMIREZ, I.; EDENS, N.K.; GRANNEMAN, J. Food intake in diabetic rats: isolation of primary metabolic effects of fat feeding. *Am J. Physiol.*, 249: R44-R51, 1985.
- FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.*, 395: 763-770, 1998.

- GAIDHU, M.P.; NICOLE, M.A, PRITAL, P.; HAWKE, T.J.; CEDDIA, R.B. 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* 298: C961-C971, 2010.
- GARCÍA, M.; PUJOL, A.; RUZO, A.; RIU, E.; RUBERTE, J.; ARBO, A.; SERAFINI, A.; ABELLAS, B.; FELIU, J.E.; BOSCH, F. Phosphofructo-1-Kinase Deficiency Leads to a Severe Cardiac and Hematological Disorder in Addition to Skeletal Muscle Glycogenosis. *PLoS Genet*, 5(8), 2009.
- GARCÍA-SÁINZ, J.A.; VÁSQUEZ-PRADO, J. del CARMEN MEDINA, L. α 1-Adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.*,389: 1-12, 2000.
- GARTON, AJ, CAMPBELL, DG.; CARLING, D.; HARDIE, D.G, COLBRAN R.J.; YEAMAN, S.J. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur J Biochem*, 179: 249 –254, 1989.
- GELDING, S.V.; COLDHAM, N.; NITHTHYANANTHAN, R.; ANYAOKU, V.; JOHNSTON, D.G. Insulin resistance with respect to lipolysis in non-diabetic relatives of European patients with type 2 diabetes. *Diabet Med* 12:66 –73, 1995.
- GINSBERG, H. N. Lipoprotein physiology and its relationship to atherogenesis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 19: 211-228,1990.
- GIRARD, J.; PERDEREAU, D.; FOUFELLE, F.; PRIP-BUUS, C.; FERRE, P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *Faseb J.*, 8: 36-42, 1994.
- GONÇALVES L.; VIEIRA, M.; FARO, C.; PROVIDENCIA, LA. Hypertrophic cardiomyopathy: a sarcomere disease? *Rev Port Cardiol.*, 16(11) :853-60, 847,1997.
- GRASSI-KASSISSE, D. M.; GÉLOEN, A. Caractérisation du sous-type des récepteurs alpha1-adrénergiques des adipocytes blancs In: GERLI, 2000 - Groupe d'étude et de Recherche sur les Lipides (GERLI), 2000, Toulouse. v.1.

- GREENBERG, D. ; SMITH, G.P. ; GIBBS, J. Intraduodenal infusions of fats elicit satiety in sham-feeding rats. *Am. J. Physiol.*, 259 : R110-118, 1990.
- HAEMMERLE, G.; ZIMMERMAN, R.; HAYN, M.; THEUSSI, C.; WAEG, G.; WAGNER, E.; SATTLER, W.; MAGIN T.M.; ZECHNER, R. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277: 4806 – 4815, 2002.
- HAFFNER, S.M., MIETTINEN, H. Insulin resistance implications for type II diabetes mellitus and coronary heart disease. *Am. J. Med.*, 103:152–162, 1997.
- HALFORD, J. C.; BLUNDELL, J. E. Pharmacology of appetite suppression. *Progr. Drug. Res.*, 54: 25-28, 2000.
- HALUZÍK, M.; FIEDLER, J.; NEDVIDKOVA, J.; CESKA, R. Serum leptin levels in patients with hyperlipidemias. *Nutrition*, 16: 429-433, 2000.
- HARWOOD, H.J. Jr. Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. *Expert Opin Ther Targets*, 9: 267 – 281, 2005.
- HATORE, E. T. Efeito da intensidade do estresse sobre marcadores metabólicos. Tese de mestrado defendida. Instituto de Biologia. Unicamp, 2006.
- HAVEL, R.J.; KANE, J.P. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 7th ed. 1841-1851, 1995.
- HIBUSE, T.; MAEDA, N.; NAGASAWA, A.; FUNAHASHI, T. Aquaporins and glycerol metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1758:1004-11, 2006.
- HIMMS-HAGEN, J. Sympathetic regulation of metabolism. *Pharmacol. Rev.*, 19 (3): 367- 461, 1967.
- HOFFLER, U.; HOBBIE, K.; WILSON, R.; BAI, R.; RAHMAN, A.; MALARKEY, D.; TRAVLOS, G.; GHANAYEM, B.I. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. *Endocr*, 36:311–325, 2009.

- HONNOR, R.C.; DHILLON, G.S.; LONDOS, C. CAMP – dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes: I. Cell preparation, manipulation and predictability in behavior. *J. Biol. Chem.*, 260: 15122-15129, 1985a.
- HONNOR, R.C.; DHILLON, G.S.; LONDOS, C. CAMP – dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes: II. Definition of steady-state relationship with lipolytic and antilipolytic modulators. *J. Biol. Chem.*, 260: 15130-15138, 1985b.
- HOUTEN, S. M.; CHEGARY, M.; BRINKE, H.; WIJNEN, W.J.; GLATZ, J.F.C.; LUIKEN, J.J.F.P.; WIJBURG, F.A.; WANDERS, R.J.A. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression is synergistically induced by AMP-activated protein kinase and fatty acids. *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 1283 – 1294, 2009.
- HOWARD, B.V., HANNAH, J.S. Dietary fat intake and diabetes. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes*, 2: 530-537, 1995.
- HUANG, B.; WU, P.; BOWKER-KINLEY, M.M.; HARRIS, R.A. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor- α ligands, glucocorticoids, and insulin. *Diabetes*, 51, 276 – 283, 2002.
- HUANG, B.; PENGFEI, W.; POPOV, K.M.; HARRIS, R.A. Starvation and Diabetes Reduce the Amount of Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase in Rat Heart and Kidney. *Diabetes*, 52(6): 1371–1376, 2003.
- HUE, L.; FELIU, J.E.; HERS, H.G. Control of gluconeogenesis and of enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. A parallel study of the effect of phenylephrine and of glucagon. *Biochem. J.*, 176 (3): 791-797, 1978
- HUE, L. and TAEGTMEYER, H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(3): E578–E591, 2009.

- IDE, T.; NAKAZAWA, T.; MOCHIZUKI, T.; MURAKAMI, K. Tissue-specific actions of antidiabetic thiazolidinediones on the reduced fatty acid oxidation in skeletal muscle and liver of Zucker diabetic fatty rats. *Metabolism*, 49: 521 – 525, 2000.
- IGNACIO, P. Alteração da perspectiva do tecido adiposo: de reserva energética a órgão regulador do metabolismo. Trabalho de Conclusão de Curso – Unicamp – Biologia – Campinas, 2008.
- ISHIBASHI, K.; KUWAHARA, M.; GU, Y.; TANAKA, Y.; MARUMO, F.; SASSAKI, S. Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem Biophys Res Commun*, 244:268-74, 1998.
- JENSEN, MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: S57–S63, 2008.
- JEOUNG, N.H.; HARRIS, R.A. Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 in Regulation of Blood Glucose Levels. *Korean Diabetes J*, 34:274-283, 2010.
- JOCKEN, JW, BLAAK E.E. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol Behav*, 94: 219 –230, 2008.
- KAHN, B.B. ; ALQUIER, T. ; CARLING, D. ; HARDIE, D.G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1: 15–25, 2005.
- KASHIWAGI, A.; FOLEY, J.E. Opposite effects of a beta-adrenergic agonist and a phosphodiesterase inhibitor on glucose transport in isolated human adipocytes: isoproterenol increases Vmax and IBMX increases Ks. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1151-1157, 1982.
- KAUFMAN, L.N., PETERSON, M.M., SMITH, S.M. Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab)*, E95-E100, 1991.

- KAWAMURA, T. et al. Regulation of skeletal muscle peroxisome proliferators-activated receptor γ expression by exercise and angiotensin-converting enzyme inhibition in fructose-fed hypertensive rats. *Hypertens. Res.*, 27: 61-70, 2004.
- KELLEY, D.E.; MOKAN, M.; MANDARINO, L.J. Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM. *Diabetes* 41:698 –706, 1992.
- KIM, J. K.; CHOI, C. S.; YOUN, J. H. Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high fat feeding in rats. *Diabetes*, 45: 651-658, 1996.
- KIM, K.H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr*, 17: 77 – 99, 1997.
- KIM, J.W. et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase : a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177 – 185, 2006.
- KNEER, N.M. & LARDY, H.A. Regulation of gluconeogenesis by norepinephrine, vasopressin, and angiotensin II: a comparative study in the absence and presence of extracellular Ca^{2+} . *Arch. Biochem. Biophys.*, 225 (1): 187-195, 1983.
- KREUZ, S.; SCHOELCH, C.; THOMAS, L.; RIST, W.; RIPPMANN, J.; NEUBAUER, H. Acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 show distinct expression patterns in rats and humans and alterations in obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 25: 577 – 586, 2009.
- 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.; LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*, 48: 275–297, 2009.
- LAMOUNIERE, J. A.; PARIZZI, M. R. Obesidade e saúde pública. CAD. *Saúde Pública*, 23(6), 2007.

- LANDSBERG, L.; YOUNG, J.B. Catecholamines and adrenal medulla. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. Williams Textbook of Endocrinology. Philadelphia: Saunders., 8ed., 621-706, 1992.
- LANGIN, D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res*, 53: 482–491, 2006.
- LANN, D.; LEROITH, D. Insulin Resistance as the Underlying Cause for the Metabolic Syndrome. *Med Clin N Am*, 91:1063-1077, 2007.
- LARGE, V.; ARNER, P. Regulation of lipolysis in humans: pathophysiological modulation in obesity, diabetes and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab.*, 24: 409-418, 1998.
- LE BOUTER, S.; RODRIGUEZ, M.; GUIGAL-STEPHAN, N. et al. Coordinate Transcriptomic and Metabolomic Effects of the Insulin Sensitizer Rosiglitazone on Fundamental Metabolic Pathways in Liver, Soleus Muscle, and Adipose Tissue in Diabetic db/db Mice. *PPAR Res*. 2010, 2010.
- LEIBEL, R.L.; EDENS, N.R.; FRIED, S.K. Physiological basis for the control of body-fat distribution in human. *Annu. Rev. Nutr.*, 9: 417-443, 1989.
- LEONARD, B.L.; WATSON, R.N.; LOOMES, K.M. et al. Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: A metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabeto*, 42: 162 – 170, 2005.
- LEROYER, S.N. et al. Rosiglitazone controls fatty acid cycling in human adipose tissue by means of glyceroneogenesis and glycerol phosphorylation. *J Biol Chem*, 281:13141–13149, 2006.
- LICHTENSTEIN, A.H., SCHWAB, U.S. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis*, 150:227–243, 2000.
- LIU, X. PERUSSE, F.; BUKOWIECKI, L.J. Chronic norepinephrine infusion stimulates glucose uptake in white and brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, 266 : R914-R920, 1994.
- LONNQVIST, F.; KRIEF, S.; STROBERG, A.D.; NYBERG, B.; EMORINE, L.J.; ARNER, P. Evidence for a functional β_3 - adrenoceptor in man. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 929-936, 1993.

- LOVEJOY, J.; MELLEN, B.; DIGIROLAMO, M. Lactate generation following glucose ingestion: relation to obesity, carbohydrate tolerance and insulin sensitivity. *Int. J. Obesity*, 14: 843-855, 1990.
- LUDVIGSEN, C.; JARETT, L.; McDONALD, J.M. The characterization of catecholamine stimulation of glucose transport by rat adipocytes and isolated plasma membrane. *Endocrinology*, 106: 786-790, 1980.
- MAEDA, N.; FUNAHASHI, T.; SHIMOMURA, I. Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 4: 627-34, 2008.
- MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R.E.; LEE, G.H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S. et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.*, 1(11): 1155–1161, 1995.
- MALMINIEMI, K., LAHTELA, J.T., HUUPPONEN, R. Effects of celiprolol on insulin sensitivity and glucose tolerance in dyslipdemic hypertension. *International Journal of Clinical Pharmacol. and Therapeutics*, 32 (3): 156-163, 1995.
- MARZZOCO, A.; TORRES B.B. *Bioquímica Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 3ed.
- MAURIEGE, P.; GALITZKY, J.; BERLAN, M. LAFONTAN M. Heterogeneous distribution of beta and alpha-2 adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences. *Eur J Clin Invest*, 17: 156 –165, 1987.
- MAYERS, R.M. ; BUTLIN, R.J. ; KILGOUR, E. ; LEIGHTON, B. ; MARTIN, D. ; MYATT, J. ; ORME, J.P. ; HOLLOWAY, B.R. AZD7545, a novel inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PDHK2), activates pyruvate dehydrogenase in vivo and improves blood glucose control in obese (fa/fa) Zucker rats. *Biochem Soc Trans*, 31:1165–1167, 2003.

- McGARRY, J.D.; BROWN, N.F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.*, 244:1–14. 95:2938–2944, 1997.
- McGARRY, J.D. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*, 51: 7 – 18, 2001.
- McTERNAN, P.G. et al. Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. *Diabetes*, 51: 1493-1498, 2002.
- MIOTTO, A.M. 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 (Ciências Biológicas (Fisiologia) - Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- MIOTTO, A.M. Alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas pela dieta hiperlipídica em ratos. Tese de doutorado defendida. Instituto de Biologia. Unicamp, 2006.
- MIRANDA, M.; CEPERUELO-MALLAFRÉ, V.; LECUBE, A.; HERNANDEZ, C.; CHÁCON, M.R.; FORT, J.M. et al. Gene expression of paired abdominal adipose AQP7 and liver AQP9 in patients with morbid obesity: relationship with glucose abnormalities. *Metabolism* 58:1762-8, 2009.
- MIYOSHI, H.; PERFIELD, J.W.; SOUZA, S.C.; SHEN, W.J.; ZHANG, H.H.; STANCHEVA, Z.S.; KRAEMER, F.B.; OBIN, M.S.; GREENBERG, A.S. Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem*, 282: 996 –1002, 2007.
- MOLLER, D.E.; KAUFMAN, K.D. Metabolic Syndrome: A Clinical and Molecular Perspective. *Annu Rev Med*, 56:45-62, 2005.
- MORIMOTO, C.; TSUJITA, T.; OKUDA, H. Antilipolytic actions of insulin on basal and hormone-induced lipolysis in rat adipocyte. *J. Lipid. Res.*, 38: 957-962, 1998.

- MORRELL, J.A. ; ORME, J. ; BUTLIN, R.J. ; ROCHE, T.E. ; MAYERS, R.M. ; KILGOUR, E. AZD7545 is a selective inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase 2. *Biochem Soc Trans*, 31:1168–1170, 2003.
- MUNDAY, M.R.; HEMINGWAY, C.J. The regulation of acetyl-CoA carboxylase—a potential target for the action of hypolipidemic agents. *Adv. Enzyme Regul.* 39:205–234, 1999.
- MUNDAY, M.R. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* 30:1059–1064, 2002.
- NIKKILA, E. A.; HUTTUNEN, J. K.; EHNHOLM, C. Postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in diabetes mellitus. Relationship to plasma triglyceride metabolism. *Diabetes*, 26: 11-21, 1977.
- NOMURA, S. WATANABE, M.; UKEI, N.; NAKAZAWA, T. Stress and beta-adrenergic receptor binding in the rat's brain. *Brain Res.*, 224 (1): 119-203, 1981.
- NONOGAKI, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*, 43: 533-549, 2000.
- NOVIN, F.; SANDERSON, J.D.; GONZALES, M. Feeding after nutrient infusion: effect of hypothalamic lesion and vagotomy. *Physiol. Behav.*, 22: 107-113, 1979.
- OLFERT, B.M.; CROSS, A.A.; WILLIAM, M.C. Guide to the Care and Use of experimental animals. *Canadian Council on Animal Care*, 213, 1993.
- OLIVECRONA, T. et al. Lipoprotein lipase: site of synthesis and sites of action. *Atheroscl. Rev*, 22: 21-25, 1991.
- OSEI, K. Insulin resistance and systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.*, 84: 33J–36J, 1999.
- PAN, D.A.; LILLIOJA, S., KRIKETOS, A.D., MILNER, M.R., BAUR, L.A., BOGARDUS, C., JENKINS, A.B., STORLIEN, L.H. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*, 46: 983–988, 1997.

- PAOLISSO, G.; TATARANNI, P.A.; FOLEY, J.E.; BOGARDUS, C.; HOWARD, B.V.; RAVUSSIN, E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia*, 38:1213–1217, 1995.
- PAPANDREOU, I.; CAIRNS, R.A.; FONTANA, L.; LIM, A.L.; DENKO, N.C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 3, 187 – 197, 2006.
- PATEL, M. S. and KOROTCHKINA, L. G. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 217 – 222, 2006.
- PATTEN, R. L. The reciprocal regulation of lipoprotein lipase activity and hormone-sensitive lipase activity in rat adipocytes. *J. Biol. Chem*, 245(21): 5577-5584, 1970.
- PEARCE, F. J.; CONNET, R. J. Effects of lactate and palmitate on substrate utilization of isolated rat soleus. *Am J. Physiol*, 238: C149-159, 1980.
- PELLEYMOUNTER, M.A. ; CULLEN, M.J. ; BAKER, M.B. ; HECHT, R. ; WINTERS, D. ; BOONE, T. ; COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269: 540-543, 1995.
- PIASCHIK, M.T.; PEREZ, D.M. α 1-Adrenergic receptors: new insights an directions. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 298: 403-410, 2001.
- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; CLAUS, T.H. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 57: 755-783, 1988.
- PINHEIRO, D.C. *et al.* Análise morfológica de adipócitos isolados de regiões mesentérica, epididimal e peri-renal de ratos submetidos a estresse. *XV Congresso interno de iniciação científica*, 26-27 setembro, p. 85, 2007.
- PORTE JR., D. Sympathetic regulation of insulin secretion. Its relation to diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.*, 123 (3): 252-260, 1969.

- PORTE JR., D.; ROBERTSON, R.P. Control of insulin secretion by catecholamines, stress, and the sympathetic nervous system. *Fed. Proc.*, 32 (7): 1792-1796, 1973.
- POSTIC, C.; GIRARD, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab*, 34:643-8, 2008.
- PREISS-LANDI, K. ; ZIMMERMANN, R. ; HAMMERLE, G. ; ZECHNER, R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 13(5):471-481, 2002.
- PRENTKI, M.; CORKEY, B.E. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?. *Diabetes*, 45: 273 – 283, 1996.
- PROIETTO, J., FILIPPIS, A., NAKHLA, C., CLARK, S. Nutrient-induced insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151: 143–149, 1999.
- PULNILKUNNIL, T.; RODRIGUES, B. Cardiac lipoprotein lipase: Metabolic basis for diabetic heart disease. *Cardiovasc Res*, 69:329-340, 2006.
- PYKALISTO, O. J.; SMITH, P. H.; BRUNZELL, J. D. Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase. Effect of diabetes and obesity on basal-and-diet-induced activity. *J. Clin. Invest.*, 56(5) : 1108-1117, 1975.
- RAHIB, L. ; MACLENNAN, N.K. ; HORVATH, S. ; LIAO, J.C. ; DIPPLE, K.M. Glycerol kinase deficiency alters expression of genes involved in lipid metabolism, carbohydrate metabolism, and insulin signaling. *European Journal of Human Genetics*, 15, 646 – 657, 2007.
- RAJI, A., et al. Insulin resistance is affected by sodium intake in nonmodulating subset of essential hypertension. *AJH*, 13 (4) part 2, 2000.

- RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., HALES, C.N., NEWSHOLME, E.A. The glucose-fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances in diabetes mellitus. *Lancet*, 1: 785-789, 1963.
- REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37: 1595-1607, 1988.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F.H; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition AdHoc Writing Committee on the Reformulation of AIN- 76A. *Journal of Nutrition, Bethesda*, v. 123, p. 1938-1951, 1993.
- REIDELBERGER, R. D. ; KALOGERIS, T.J. ; LEUNG, P.M. ; MENDEL, V.E. Postgastric satiety in the sham-feeding rat. *Am. J. Physiol.*, 244 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 13): R872-R881, 1983.
- RESHEF, L.; HANSON, R.W.; BALLARD, F.J. Glyceride-glycerol synthesis from pyruvate: adaptive changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in adipose tissue and liver. *J Biol Chem*, 244:1994 – 2001, 1967
- RESHEF, L.; HANSON, R.W.; BALLARD, F.J. A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue. *J Biol Chem*, 245:5979 –5984, 1970.
- RESHEF, L.; OLSWANG, Y.; CASSUTO, H.; BLUM, B.; CRONIGER, C.M.; KALHAN, S.C.; TILGHMAN, S.M.; HANSON, R.W. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem*, 278:30413-6, 2003.
- RETANA-MARQUEZ, S.; BONILLA-JAIME, H.; VAZQUEZ-PALACIOS, G.; DOMINGUEZ-SALAZAR, E.; MARTINEZ-GARCIA, R.; VELAZQUEZ- MOCTEZUMA, J. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psiconeuroendocrinol.*, 28 (2): 207-227, 2003.

- RISTOW, M.; VORGERD, M.; MÖHLIG, M.; SCHATZ, H.; PFEIFFER, A. Deficiency of phosphofructo-1-kinase/muscle subtype in human impairs insulin secretion and causes insulin resistance. *J. Clin. Invest*, 100: 2833-2841, 1997.
- RISTOW, M.; VORGERD, M.; MÖHLIG, M.; SCHATZ, H.; PFEIFFER, A. Insulin resistance and impaired insulin due to phosphofructo-1-kinase - deficiency in humans. *J. Mol. Med*, 77: 96-103, 1999.
- ROCHE, T. E. and HIROMASSA, Y. Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cell Mol. Life Sci*. 64, 830 – 849, 2007.
- RODBELL M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem*, 239 (2): 375 – 380, 1964.
- RODRIGUES, M. J. M. Exercício de natação previne alterações cardiovasculares, bioquímicas e histológicas induzidas por dieta hiperlipídica em ratos Wistar. Tese de Mestrado. Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia. Instituto de Biologia-UNICAMP, 2009.
- RODRÍGUEZ, A.; CATALÁN, V.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; FRÜHBECK, G. Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. *FEBS Lett*, 580:4771-6, 2006.
- RODRÍGUEZ, A.; CATALÁN, V.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; FRÜHBECK, G. Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control. *Cell Cycle*, 10(10): 1548-1556, 2011.
- ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444(7121):847-853, 2006.
- RUDERMAN, N.B.; SAHA, A.K.; VAVVAS, D.; WITTERS, L.A. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol*, 276: E1 – E18, 1999.
- RUDERMAN, N.; PRENTKI, M. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov*, 3: 340 – 351, 2004.

- SADUR, C. N.; ECKEL, R. H. Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J. Clin. Invest*, 69(5): 1119-1125, 1982.
- SAGGERSON, D. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr*, 28: 253 – 272, 2008.
- SALTIEL, A.R.; KAHN, R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414:799-805, 2001.
- SAMUEL, V.T. ; LIU, X-Z. ; QU, X. ; ELDER, B.D. ; BLIZ, S. ; BEFROY, D. ; ROMANELLI, A.J. ; SHULMAN, G.I. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31): 32345–32353, 2004.
- SAVAGE, D.B. ; CHOI, C.S. ; SAMUEL, V.T. ; LIU, Z-X. ; ZHANG, D. ; WANG, A. ; ZHANG X.M. ; CLINE, G.W. ; YU, X.X. ; GEISLER, J.G. ; BHANOT, S. ; MONIA, B.P. ; SHULMAN, G.I. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J. Clin. Invest*, 116(3): 817-24, 2006.
- SCHRAMM, J.M.A. ; OLIVEIRA, A. F.; LEITE, I. C.; VALENTE, J. G.; GADELHA, Â. M. J.; PORTELA, M. C.; CAMPOS, M. R. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 9(4): 897-908, 2004.
- SCHWARTZ, M.W. ; WOODS, S.C. ; PORTE D. JR. ; SEELEY, R.J. ; BASKIN, D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404: 661-671, 2000.
- SCHWEIGER, M. ; SCHREIBER, R. ; HAEMMERLE, G. ; LASS, A. ; FLEDELIUS, C. ; JACOBSEN, P. ; TORNQUIVIST, H. ; ZECHNER, R. ; ZIMMERMANN, R. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem*, 281: 40236 –40241, 2006.

- SERKOVA, N.J.; JACKMAN, M.; BROWN, J.L. et al. Metabolic profiling of livers and blood from obese Zucker rats. *J Hepatol*, 44: 956 – 962, 2006.
- SHEN, W.J.; PATEL, S.; NATU, V.; KRAEMER, F.B. Mutational analysis of structural features of rat hormone-sensitive lipase. *Biochemistry*, 37: 8973– 8979, 1998.
- 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*, 6: 897-904, 2002.
- SRINIVASAN, K.; VISWANAD, B.; ASRAT, L.; KAUL, C.L.; RAMARAO, P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research*, 52: 313–320, 2005.
- STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B.J.; VAN HAEFTEN, T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 365: 1333–1346, 2005.
- SU C.L.; SZTALRYD, C.; CONTRERAS, J.A.; HOLM, C.; KIMMEL, A.R.; LONDOS, C. Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J Biol Chem*, 278: 43615–43619, 2003.
- SUGDEN, M.C; KRAUS, A.; HARRIS, R. A.; HOLNESS M.J. Fibre-type specific modification of the activity and regulation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) by prolonged starvation and refeeding is associated with targeted regulation of PDK isoenzyme 4 expression. *Biochem J*, 346:651–657, 2000.
- SUGDEN, M.C.; BULMER, K.; HOLNESS, M.J. Fuel-sensing mechanisms integrating lipid and carbohydrate utilization. *Biochem Soc Trans*, 29:272–278, 2001
- SUGDEN, M.C.; HOLNESS, M.J. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284:E855–E862, 2003

- SUGDEN, M.C. and HOLNESS, M. J. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch. Physiol. Biochem.* 112, 139 – 149, 2006.
- SZTALRYD, C.; KRAEMER, F.B. Differences in hormone-sensitive lipase expression in white adipose tissue from various anatomic locations of the rat. *Metabolism*, 43: 241–247, 1994
- SZTALRYD, C. et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol*, 161:1093–1103, 2003.
- TANSEY, J.T. et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 6494 –6499, 2001.
- TASKINEN, M. R. Lipoprotein lipase activity and serum lipoprotein in untreated type 2 (insulin-dependent) diabetes associated with obesity. *Diabetologia*, 22: 46-50, 1982.
- TASKINEN, M. R. Lipoprotein lipase in hypertriglyceridemias. In: Borensztajn J. editor. Lipoprotein lipase. *Chicago: Evener Publisher*; p. 201-228, 1987.
- TAYLOR, W.M.; MAK, M.L.; HALPERIN, M.L. Effect of 3',5'-cyclic AMP on glucose transport in rat adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 4359-4363, 1976.
- TORDJMAN, J.; CHAUVET, G.; QUETTE, J.; BEALE, E.; FOREST, C.; ANTOINE, B. Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. *J Biol Chem*, 278:18785–18790, 2003.
- UPTON, R., WINDOWSONS, P.S., ISHII, S., et al. Improved metabolic status and insulin sensitivity in obese fatty (fa/fa) Zucker rats and Zucker diabetic fatty (ZDF) rats treated with thiazolidinedione, MCC-555. *Br. J. Pharmacol.*, 125: 1708-1214, 1998.
- VAUGHAN, M. The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *J Biol Chem*, 237:3354 –3358, 1962.

- VERAGO, J.L.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 34 (9): 1197-1207, 2001.
- VERMELHO, L. L.; MONTEIRO, M. F. G.; COSTA, A. J. L.; KALE, P. L. Transição epidemiológica e indicadores de saúde atuais. *Cad. Saúde Coletiva*, 9(2): 111-126, 2001.
- VESTERGAARD, H.; SKOTT, P.; STEFFENSEN, R.; WROBLEWSKI, H.; PEDERSEN, O.; KASTRUP, J. Insulina-Resistant Glucose Metabolism in Patients With Microvascular Angina-Syndrome X. *Metabolism*, 44 (7): 876-882, 1995.
- VETTOR, R. *et al.* JEANRENAUD, B. Lactate infusion in anesthetized rats produces insulin resistance in heart and skeletal muscles. *Metabolism*, 46: 684-690, 1997.
- WAKI, H.; TONTONOZ, P. Endocrine Functions of Adipose Tissue. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2: 31-56, 2007.
- WAKIL, S.J.; STOOPS, J.K.; JOSHI, V.C. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem*, 52:537-579, 1983.
- WAKIL, S.J.; ABU-ELHEIGA, L.A. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res*, 50: (Suppl.): S138 – S143, 2009.
- WANG, H.; ECKEL, R.H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297:E271- E288, 2009.
- WANG, H.; HU, L.; DALEN, K. ; DORWARD, H. ; MARCINKIEWICZ, A. ; RUSSELL, D. ; GONG, D. ; LONDOS, C. ; YAMAGUCHI, T. ; HOLM, C. ; RIZZO, M. ; BRASAEMLE, D. ; SZTALRYD, C. Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps: protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *J Biol Chem*, 284: 32116 –32125, 2009.

- WATT, M.J.; HOWLETT, K.F.; FEBBRAIO, M.A.; SPRIET, L.L.; HARGREAVES, M. Adrenaline increases skeletal muscle glycogenolysis, pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. *J. Physiol.*, 534 (1): 269-278, 2001.
- WIDHALM, K.; GHODS, E. Nonalcoholic fatty liver disease: a challenge for pediatricians. *Int J Obes*, 34:1451-67, 2010.
- WIDMER, J.; FASSIHI, K.S.; SCHLICHTER, S.C. et al. Identification of a second human acetyl-CoA carboxylase gene. *Biochem J*, 316(Pt 3): 915 – 922, 1996.
- WOLF-NUNES, V., MIOTTO, A.M., FARIAS-SILVA, E., GRASSI-KASSISSE, D.M., SPADARI-BRATFISCH, R.C. Plasmatic levels of cholesterol, triglycerides and glucose of normo- and hypercholesterolemic rats treated whit Croton cajucara Benth In: XVI Latinamerican Congress of Pharmacology, XXXII Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, II Iberoamerican Congress of Pharmacology, VII Interamerican congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2000, São Paulo/SP. XVI Latinamericana Congress of Pharmacology, XXXII Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, II Iberoamerican Congress of Pharmacology, VII Interamerican congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 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.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva, 2000. 265 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva, 2002. 230 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva, 2003. 148 p.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>. Acesso em: 20 Maio 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/#>. Acesso em: 20 Maio 2011.
- WU, P.; SATO, J.; ZHAO, Y. et al. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J*, 329:97–201, 1998.
- WU, P.; INSKEEP, K.; BOWKER-KINLEY, M.M. et al. Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes*, 48:1593–1599, 1999.
- WU, P.; BLAIR, P.V.; SATO, J. et al. Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys*, 381:1–7, 2000.
- WU, P.; PETERS, J.M.; HARRIS, R.A. Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 287:391–396, 2001.
- YE, J.M.; DZAMKO, N.; CLEASBY, M.E.; HEGARTY, B.D.; FULER, S.M.; COONEY, G.J.; KRAEGEN, E.W. Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia*, 47:1306–1313, 2004.
- YKI-JARVINEN, H., BOGARDUS, C; FOLEY, J.E. Regulation of plasma lactate concentration in resting human subjects. *Metabolism*, 39(8): 859-864, 1990.
- YOREK, M.A.; RUFO JR., G.A.; RAY, P.D. Gluconeogenesis in rabbit liver. III. The influences of glucagon, epinephrine, alpha- and beta-adrenergic agents on gluconeogenesis in isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 632 (4): 517-526, 1980.

YOSHIDA, T. The antidiabetic beta-3-adrenoceptor agonist BRL26830 works by release of endogenous insulin. *Am. J. Clin. Nutr.*, 55 (suppl 1): 237S-241S, 1992.

ZIMMERMANN, R.; STRAUSS, J.G.; HAEMMERLE, G. et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306: 1383–1386, 2004.

ANEXO I
DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada **EXPRESSÃO DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE TRIACILGLICEROL EM TECIDOS ADIPOSEO E HEPÁTICO ISOLADOS DE RATOS NORMO E HIPERLIPIDÊMICOS**

() 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) CEEA – Comissão de Ética na Experimentação Animal, protocolo No. 1915-1, Instituição: Unicamp.

() 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: Marcela Palomo Pieroni Bellenzani


Orientador: Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) 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

ANEXO II



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

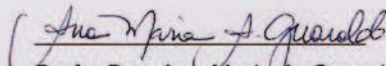
CERTIFICADO

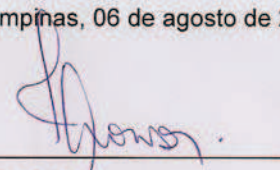
Certificamos que o Protocolo nº **1915-1**, sobre "**Expressão de enzimas envolvidas na produção de lactato e triacilglicerol em tecidos adiposo e hepático isolados de ratos normo e hiperlipidêmicos**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse / Marcela Palomo Pieroni Bellenzani**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **06 de agosto de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1915-1**, entitled "**Enzymes expression involved in lactate and triacylglycerols production in the hepatic and adipose tissue of normo and hyperlipidemic rats**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **August 6, 2009**.

Campinas, 06 de agosto de 2009.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva