HELENA FONSECA RAPOSO

"Estudo dos mecanismos envolvidos na redução de adiposidade de camundongos que super-expressam a proteína de transferência de colesteril éster (CETP)"

CAMPINAS 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

HELENA FONSECA RAPOSO

Estudo dos mecanismos envolvidos na redução de adiposidade de camundongos que super-expressam a proteína de transferência de colesteril éster (CETP).

Constant of the owner of	Este exemplar corresponde à redação final
AL CALCUTATION OF ALL OF A	da tese defendida pelo(a) candidato (a)
A MANAGEMENT OF CAMPAGE	Helena Jonsica Raposo-
Concession of the local division of the loca	- Poleme Holwine
and a second sec	e aprovada pela Comissão Juigadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

CAMPINAS, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R182e	Raposo, Helena Fonseca, 1981- Estudo dos mecanismos envolvidos na redução de adiposidade de camundongos que super-expressam a proteína de transferência de colesteril éster (CETP) / Helena Fonseca Raposo. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.
	Orientador: Helena Coutinho Franco de Oliveira. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Proteínas de transferência de ésteres de colesterol. Lipólise. Adiposidade. Oliveira, Helena Coutinho Franco de, 1958 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Study of the mechanism related to adiposity reduction in cholesteryl ester transfer protein (CETP) overexpressing mice Palavras-chave em Inglês: Cholesterol ester transfer proteins Lipolysis Adiposity Área de concentração: Fisiologia Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular Banca examinadora: Helena Coutinho Franco de Oliveira [Orientador] Edna Regina Nakandakare Maria Isabel Cardoso Alonso Vale Marcio Alberto Torsoni Luiz Carlos Carvalho Navegantes Data da defesa: 25-01-2013 Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 25 de janeiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

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

Assinatura

Profa. Dra. Edna Regina Nakandakare

Profa. Dra. Maria Isabel Cardoso Alonso Vale

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Profa. Dra. Fernanda Ortis

Profa. Dra. Patricia de Oliveira Prada

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

Assinatura Assinatura Assinatura Assinatura Assinatura Assinatura Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Dedicatória

Ao Gustavo, meu marido, pela decisão de me apoiar e incentivar.

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Metabolismo de Lípides** da Área de Fisiologia e Biofísica do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – **UNICAMP**, com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**Fapesp**, processos 2008/53455-7, 2011/20136-9, 2006/59786-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**, processo 304532/2010-0), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT – Obesidade e Diabetes (CNPq e Fapesp), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) – Programa de Pósgraduação em Biologia Funcional e Molecular da UNICAMP.

Agradecimentos

A realização desta tese marca o final de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Agradeço às agências brasileiras de fomento Fapesp, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

À minha orientadora, Profa. Helena Coutinho Franco de Oliveira pela constante contribuição no meu amadurecimento científico.

Aos professores Everardo M. Carneiro, Antonio C. Boschero e todos os alunos e pesquisadores do laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo.

Aos amigos do laboratório 15, Gabriel Dorighello, Adriene Paiva, Juliana Rovani, Larissa Kato, Janaína Christovam, Patrícia Patrício, Luiz Fernando Batista, Maricene Sahba e Aline Foffano pela ajuda, troca de conhecimentos e, principalmente, companheirismo.

A Mariana C. Simões, Elisa de A. Jackix, Carina Malaguti, Emerielle C. Vanzela, Fernanda Ortis, Jane Souza e Andressa Coope agradeço, sobretudo, pela amizade dentro e fora dos laboratórios.

Aos funcionários da Unicamp, especialmente Andréia A. Vigilato e Marise M. Carnelossi por estarem sempre sorridentes e dispostas a ajudar.

A Danúbia Frasson, Profa. Dora Maria Grassi-Kassisse, seus alunos Tiago e Danilo, por me ajudarem no início da padronização dos experimentos com adipócitos isolados e lipólise.

vi

Ao Prof. Aníbal E. Vercesi, Prof. Edgard Graner, Karina G. Zecchin, Marco A. Carvalho e Michelle Agostini pelas produtivas colaborações.

A Profa. Hei Sook Sul e seu grupo de pesquisa, Olga Gulyaeva, Jon Dempersmier, Devon Hunerdosse, Carolyn Hudak, Di Yang, Tianyi Tang e Yuhui "Dawn" Wang pela receptividade e boa convivência durante o estágio na Universidade da Califórnia, Berkeley.

Agradeço à minha família e às minha amigas, quase irmãs, pelo apoio e generosas demonstrações de orgulho.

Sumário

I.	Resumo1
II.	Abstract 2
III.	Introdução5
IV.	Objetivos
V.	Materiais e Métodos 31
VI.	Resultados 45
a.	Tabela 1. Níveis plasmáticos de triglicérides (TG), colesterol (COL), ácidos graxos não esterificados (NEFA)
b.	Figura 1. A expressão da CETP reduz a adiposidade 46
C.	Tabela 2. Conteúdo de gordura no fígado e músculo (%) 46
d.	Figura 2. A expressão da CETP não afeta ingestão ou excreção de gordura
e.	Figura 3. A expressão da CETP não altera lipogênese 48
f.	Figura 4. A expressão da CETP não altera a captação tecidual de glicose
g.	Figura 5. A expressão da CETP não altera retenção tecidual de lipídeos
h.	Figura 6. A expressão da CETP aumenta lipólise <i>in vivo</i> no estado alimentado
i.	Figura 7. A expressão da CETP aumenta a lipólise estimulada em adipócitos isolados

j.	Figura 8. A expressão da CETP aumenta o gasto energético corporal
k.	Tabela 3. A expressão da CETP não altera quociente respiratório (VCO ₂ /VO ₂) 54
I.	Figura 9. A Expressão da CETP aumenta a razão colesterol/triglicérides no tecido adiposo subcutâneo
m	 Figura 10. A Expressão da CETP modula positivamente genes envolvidos na lipólise e no transporte de ácidos graxos em tecido adiposo visceral
n.	Figura 11. Expressão de genes em tecido adiposo subcutâneo de camundongos que expressam CETP e controles
0.	Figura 12. A Expressão da CETP modula positivamente genes envolvidos na lipólise, no transporte de ácidos graxos e na termogênese em tecido adiposo marrom
p.	Figura 13. A Expressão da CETP aumenta a expressão proteica de receptor beta3-adrenérgico em tecido adiposo marrom e visceral 60
VII.	Discussão 61
a.	Figura 14. Resumo da ação da CETP sobre a função dos adipócitos
VIII.	Referências
IX.	Anexos
1.	Manuscrito sobre o estudo da superexpressão da apo CIII, submetido para publicação

Apolipoprotein CIII overexpression exacerbates high fat dietinduced adiposity by modulating lipid storage, lipogenesis and lipolysis rates

- Autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal e da da Comissão Interna de Biossegurança
- 3. Resumos dos artigos publicados durante o doutorado:
 - A soyabean diet does not modify the activity of brown adipose tissue but alters the rate of lipolysis in the retroperitoneal white adipose tissue of male rats recovering from early-life malnutrition. Paiva AA, Faiad JZ, Taki MS, de Lima Reis SR, de Souza LM, Dos Santos MP, Chaves VE, Kawashita NH, Oliveira HC, **Raposo HF**, Carneiro EM, Latorraca MQ, Gomes-da-Silva MH, Martins MS. Br J Nutr. 2012 Sep 28;108(6):1042-51. doi: 10.1017/S0007114511006180. Epub 2011 Dec 12.
 - Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. Zecchin KG, Rossato FA, **Raposo HF**, Melo DR, Alberici LC, Oliveira HC, Castilho RF, Coletta RD, Vercesi AE, Graner E. Lab Invest. 2011 Feb;91(2):232-40. Epub 2010 Aug 30.
 - Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. C arvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel AL, Veiga SS, **Raposo HF**, Oliveira HC, Loda M, Coletta RD, Graner E. Int J Cancer. 2008 Dec 1;123(11):2557-65.

RESUMO

A proteína de transferência de colesteril éster (CETP) transfere colesterol esterificado (CE) das HDL para as lipoproteínas que contêm apo B, em troca de triglicérides. Assim, a CETP promove a redução dos níveis de HDL-colesterol no plasma, aumentando o risco de aterosclerose. Recentemente, nosso grupo verificou que camundongos transgênicos que expressam a CETP (CETP-Tg) apresentam menor adiposidade que os controles não transgênicos (NTg). Neste trabalho investigamos possíveis mecanismos que expliquem a redução da adiposidde. Camundongos CETP-Tg e controles NTg (C57/BL6 background) foram tratados com dieta padrão desde o desmame até os 5 meses de idade. Camundongos CETP-Tg apresentaram redução nos depósitos de tecido adiposo (~30%). Essa redução da adiposidade não foi compensada por deposição ectópica de lipídeos no fígado ou músculo, nem foi consequência de alteração do balanço de gordura (ingestão vs. excreção). Lipogênese in vivo e em adipócitos isolados (estimada por ³H₂O e ¹⁴C-acetato) foram similares entre os grupos. A retenção de lipídeos exógenos e a captação de glicose pelo fígado, músculo e tecidos adiposos (estimada após dose oral de ³H-trioleina e injeção IP de ³H-2deoxiglicose, respectivamente) não evidenciaram nenhuma diferença entre os genótipos. No estado alimentado, a expressão da CETP aumentou (~50%) a lipólise basal in vivo e estimulada por isoproterenol em adipócitos isolados. Coerentemente, os níveis de RNAm para HSL (hormone sensitive lipase) e ATGL (adipose triglyceride lipase) estavam aumentados, assim como FATP1 (fatty acid transport protein 1). No tecido tecido adiposo marrom, verificou-se elevação nos níveis de ATGL, FATP1 e UCP1 (uncoupling protein 1). Além disso, o conteúdo protéico do receptor beta 3 adrenérgico também estava aumentado nos extratos de membrana celular de tecido adiposo visceral e marrom dos animais CETP-Tg. A expressão da CETP também elevou em cerca de 10% a taxa metabólica corporal (VO₂ e gasto energético). Conclui-se que a CETP altera a expressão e/ou função de proteínas relacionadas à lipólise e termogênese, aumentando o gasto energético global e reduzindo a massa de gordura corporal. Em conjunto, esses resultados sugerem uma nova função antiadipogênica para a CETP.

ABSTRACT

Cholesteryl ester transfer protein (CETP) is a plasma protein that mediates the exchange of triglycerides for esterified cholesterol from HDL to the apoB containing lipoproteins. In this way, CETP promotes reduction of plasma HDLcholesterol and, thus, increases the risk of atherosclerosis. Recently, we found that CETP expressing mice (CETP-Tg) presented less adipose tissue mass than nonexpressing controls. In this work we investigated possible mechanisms to explain these findings. CETP-Tg and non-transgenic (NTg) control mice (C57/BL6 background) were fed with chow diet from weaning to 5 month of age. CETP-Tg mice had reduced visceral and subcutaneous fat depots (~30%) that was not compensated by lipid ectopic deposition and could not be explained by differences in fat intake and excretion. Lipogenesis rates in vivo and in isolated adipocytes (estimated using ³H₂O and ¹⁴C-acetate) were similar in both CETP-Tg and control mice. Lipid retention and glucose uptake by liver, muscle and adipose tissues (estimated after an oral dose of ³H-triolein and IP injection of ³H-deoxiglucose) showed no significant differences between groups. In the fed state, CETP group showed higher (~50%) basal lipolysis rates in vivo and in isoproterenol stimulated lipolysis rates in isolated adipocytes. In accordance, visceral adipose hormone sensitive lipase (HSL) and adipose triglyceride lipase (ATGL) mRNA expression were elevated, as well as fatty acid transport protein (FATP1). In brown adipose tissue, ATGL, FATP1 and uncoupling protein 1 (UCP1) were increased. Furthermore, beta 3 adrenergic receptor protein mass were upregulated in visceral and brown adipose tissues membrane extracts. In addition, whole body energy expenditure (measured by respirometry) was found to be elevated in CETP-Tg mice (10%). In conclusion, CETP change expression and function of proteins related to lipolysis and thermogeneis, thus, increasing whole body energy expenditure and resulting in less body fat content. These findings disclose a novel anti-adipogenic role for CETP.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC1: acetyl-CoA carboxylase 1

AGCL: ácidos graxos de cadeia longa

AMPK: AMP-activated protein kinase

ATGL: adipose triglyceride lipase

BAT: brown adipose tissue

BPI: bactericidal permeability increasing protein

C/EBPs: CCAAT enhancer binding proteins

CACT: carnitine acylcarnitine translocase

¹⁴CCE: ¹⁴C-colesteril-éster

CE: colesteril éster

CETP: colesteril ester transfer protein/ proteína de transferência de colesteril éster

ChREBP: carbohydrate response element binding protein

COL: colesterol

CPT: carnitine palmitoyltransferase

Dio2: type 2 deiodinase

GET: gasto energético total

ERRs: estrogen-related receptors

FABP: fatty acid biding protein

FAS: fatty acid synthase

FAT/CD36: fatty acid translocase

FATP: fatty acid transport protein

G3P: glicerol-3-fosfato

GLUT: transportadores de glicose

HDL: high density lipoprotein

HSL: hormone sensitive lipase

IDL: intermidiate density lipoprotein

IMC: índice de massa corpórea

LBP: lipopolissacaryde binding protein

LDL: low density lipoprotein

LP: lipoproteína

LPL: lipoproteína lipase

MGL: monoacilglicerol lipase

NE: norepinefrina

NEFA: ácidos graxos não esterificados

NTg: não transgênico

PGC1α: *PPARy-coativator-1α*

PKA: proteina kinase A

PPARs: peroxissome proliferator activated receptors

RIP140: receptor-interacting protein-140

QR: quociente respiratório

RXR: receptor do ácido 9-cis retinóico

SREBP-1c: sterol regulatory element binding protein-1c

TG: triglicérides

TO: trioleína

TRC: Transporte Reverso de Colesterol

TRs: thyroid hormone receptors

UCP: uncoupling protein

VCO₂: volume de dióxido de carbono

VLDL: very low density lipoprotein

VO₂: volume de oxigênio

WAT: white adipose tissue

INTRODUÇÃO

Obesidade

Obesidade pode ser definida como acúmulo de gordura corporal, o que pode comprometer a saúde, manifestando-se como doença. Apresenta-se de forma heterogênea, sendo derivada de múltiplas causas que afetam o balanço energético. O conteúdo de gordura corporal é resultado da interação de fatores genéticos, ambientais e psicológicos, que interferem tanto na quantidade de energia ingerida quanto na gasta (Kopelman, 2000).

Sobrepeso e obesidade estão associados com morte por causas cardiovasculares e não cardiovasculares na população em geral (Whitlock et al., 2009; Coutinho et al., 2011).

Nas últimas décadas, a incidência de obesidade praticamente triplicou em algumas regiões da América do Norte, Europa e Pacífico (OMS, 2003). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, em 2008, mais de 1,4 bilhões de adultos no mundo apresentavam sobrepeso e, destes, mais de 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres eram obesos (OMS, 2012).

Em certos países, como a China e o Japão, o número de obesos não ultrapassa 5% da população; já nos Estados Unidos e em parte da Europa, cerca de dois terços dos adultos estão acima do peso (James, 2004). A obesidade, no entanto, não está restrita a países desenvolvidos, uma vez que o número de indivíduos com excesso de peso vem crescendo também na América Latina, Caribe e Ásia (OMS, 2003; James 2004). No Brasil, estudos populacionais demonstram uma transição, na qual, entre mulheres, são encontrados dois casos

de obesidade para cada caso de desnutrição, exatamente o inverso do observado há pouco mais de 30 anos (Monteiro *et al.*, 2004). Por meio de inquéritos nutricionais realizados em três décadas consecutivas, foi identificada a prevalência da obesidade na população adulta das regiões mais distintas do Brasil, a Nordeste e a Sudeste. Em ambas, nos períodos de 1975, 1989 e 1997, observou-se um aumento na prevalência da obesidade (região Nordeste: 2,7%, 5,1% e 8,5%; região Sudeste: 5,4% 9,9%, 10,4%) e queda nos valores de desnutrição (região Nordeste: 9,2%; 7,4% e 5,9%; região Sudeste: 9,8%, 5,1%, 4,2%), confirmando assim o quadro de transição nutricional (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OBESIDADE, 2004).

Pesquisa recente realizada pela Secretaria de Vigilância em Saúde estimou que, em 2011, quase 50% da população adulta apresentava sobrepeso (IMC \ge 25 kg/m²) e mais de 15% obesidade (IMC \ge 30 kg/m²). Em ambos os quadros, maior frequência foi verificada nos homens no estrato de mais escolaridade e, em mulheres, no estrato de menos escolaridade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012)

Os dados epidemiológicos evidenciam um claro crescimento da obesidade, com todas as suas consequências na saúde dos indivíduos. Conhecida como uma condição de causa multifatorial, o controle da obesidade é complexo e depende do entendimento de aspectos sociais e biológicos. Nesse sentido, dentre os aspectos biológicos, a compreensão dos fatores que determinam o desenvolvimento e função do tecido adiposo torna-se cada vez mais importante.

Obesidade e dislipidemias

A relação entre dislipidemias e obesidade já é bastante conhecida. Vários estudos relacionam o excesso de adiposidade com alterações no perfil lipídico como hipertrigliceridemia e redução de HDL-colesterol, além de hipertensão, intolerância à glicose e/ou resistência à insulina (Cercato *et al.*, 2004; Ten & Maclaren, 2004; Isomaa *et al.*, 2001). Conjuntamente, esse quadro é indicativo de síndrome plurimetabólica, que está diretamente relacionada ao aparecimento de aterosclerose prematura e à elevação da morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares (Isomaa *et al.*, 2001). Além de apresentarem maior incidência de doenças cardiovasculares, indivíduos obesos também são mais propensos ao desenvolvimento de diabetes, de certos tipos de câncer (mama, colon, próstata, útero, rins e vesícula biliar) e outros problemas não fatais, mas debilitantes como dificuldade respiratória, problemas de pele, infertilidade e desordens músculo-esqueléticas (Ten & Maclaren, 2004; OMS, 2004).

Em indivíduos obesos, a dislipidemia, comumente caracterizada por hipertrigliceridemia parece decorrente do estado de resistência à insulina que acompanha a obesidade. Nessa situação ocorre a superprodução hepática de VLDL, devido ao maior aporte de ácidos graxos provenientes do aumento da lipólise do tecido adiposo (Watson *et al.*, 2003).

Investigações mais recentes têm relacionado alterações no transporte plasmático de lipídeos a fatores de risco para obesidade. Alguns estudos sugerem que proteínas primariamente relacionadas ao metabolismo de lipoproteínas no plasma podem afetar significativamente o processo de acúmulo de gordura corporal. Estudos com camundongos apo E *kcnockout*, mostram que a deficiência

de apo E resulta em menor massa adiposa (Huang et al., 2006; Hofmann et al., 2008) e protege contra obesidade genética (Gao et al., 2007), além de reduzir a inflamação no tecido adiposo (Wang et al., 2012). Acredita-se que a deficiência da apo E diminuiria a atividade da lipoproteína lípase (LPL), reduzindo o aporte de ácidos graxos para o tecido adiposo (Voshol et al.; 2009).

Paralelamente, proteínas inibidoras da LPL também foram relacionadas com alterações do acúmulo de gordura no tecido adiposo. Nesse sentido, a superexpressão da apo CI protegeria contra a obesidade e resistência à insulina (Jong et al., 2001), enquanto a deficiência de apo CIII teria o efeito oposto (agravo da obesidade e resistência à insulina) (Duivenvoorden et al., 2005). Salerno et al. (2007) mostram que a superexpressão da apo CIII aumenta enquanto a CETP reverte obesidade induzida por dieta em camundongos transgênicos.

Tecido adiposo

O tecido adiposo e suas células têm sido amplamente estudados devido à sua relação íntima com a obesidade e desordens metabólicas associadas, como resistência à insulina, diabetes, dislipidemias e hipertensão.

Por muito tempo o tecido adiposo foi considerado um mero depósito de gordura. Apenas após 1994, quando o gene para leptina foi clonado (Zhang et al., 1994), reconheceu-se que o tecido adiposo tem também uma função endócrina, participando ativamente da homeostase energética. Hoje sabe-se que os adipócitos secretam inúmeras citocinas (então chamadas adipocinas), dentre elas adiponectina, resistina, TNFa e IL-6 (Kim e Moustaid Moussa, 2000). Por meio das adipocinas o tecido adiposo atua na regulação da alimentação, nos metabolismos

de glicose e lipídeos, imunidade, termogênese e função cardiovascular (revisado por Mattu & Randeva, 2013).

O tecido adiposo de mamíferos pode ser classificado em branco (*White Adipose Tissue*: WAT) ou marrom (*Brown Adipose Tissue*: BAT). O tecido adiposo branco é especializado em estocar o excesso de energia, possuindo, para isso, toda a maquinaria necessária para a síntese e armazenamento de triglicérides (TG) (Kajimura et al., 2008). As células do tecido adiposo branco possuem gotícula lipídica única, que ocupa a maior parte de seu volume, comprimindo o núcleo e organelas na periferia celular (Henry et al., 2012). O tecido adiposo branco compõe-se de 35 a 75% de adipócitos, sendo o restante estroma vascular, células endoteliais e sanguíneas, fibroblastos, macrófagos, pré-adipócitos, dentre outros (Cinti, 2009).

O tecido adiposo marrom, por sua vez, é altamente inervado e especializado em termogênese, promovendo a dissipação de energia química na forma de calor, em resposta ao frio ou ao excesso de alimentação (Kajimura et al., 2008). Seus adipócitos apresentam múltiplas gotículas lipídicas e alta densidade de mitocôndrias (Koppen e Kalkhoven, 2010). O tecido adiposo marrom é, também, caracterizado pela alta expressão de UCP1 (*Uncoupling Protein-1*), proteína da membrana interna da mitocôndria, praticamente exclusiva de células do tecido adiposo marrom. A UCP1 é responsável pelo transporte de prótons, do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, promovendo a dissipação do gradiente eletroquímico normalmente usado na síntese de ATP (Klingenberg, 1999). Nesse sentido, diferentemente do tecido adiposo branco, que está diretamente relacionado com a obesidade, o tecido adiposo marrom, por apresentar alta

capacidade oxidativa, pode influenciar no aumento da taxa metabólica corporal, reduzindo a obesidade (Kajimura et al., 2008, Lowell e Spiegelman, 2000). Há muito tempo sabe-se que o tecido adiposo marrom tem importância na defesa contra o frio, sobretudo em pequenos mamíferos como camundongos e animais que hibernam, como o urso polar. Em humanos, porém, acreditava-se que o tecido adiposo marrom, abundante no nascimento, era logo substituído por tecido adiposo branco, sendo considerado relativamente escasso como tecido em adultos (Lean e James, 1986). Recentes evidências da presença de tecido adiposo marrom em humanos adultos, no entanto, têm levado ao crescente interesse pela compreensão do desenvolvimento e fisiologia desse tecido. Depósitos de tecido adiposo marrom foram identificados por PET-CT (Positron emission tomography - computed tomography) em região que abrange do pescoço ao tórax (Cypess et al., 2009; Enerbäck et al., 2010). Espera-se que a identificação de mecanismos que estimulem o desenvolvimento e função do tecido adiposo marrom em humanos venha a ser uma opção terapêutica na redução da obesidade e doenças associadas. De fato, a atividade do tecido adiposo marrom mostrou-se inversamente relacionada à obesidade, sobretudo no envelhecimento (Cypess et al., 2009). Além disso, depósitos ectópicos de tecido adiposo marrom no músculo esquelético de camundongos protegeram contra a obesidade induzida por dieta (Almind et al., 2007).

Metabolismo de ácidos graxos e triglicérides

O tecido adiposo branco tem como função primária o estoque de energia na forma de lipídeos, sendo importante para isso os processos de síntese, captação, esterificação e liberação de ácidos graxos.

A síntese de ácidos graxos e colesterol pode ocorrer em qualquer célula, mas estas vias são particularmente importantes no fígado e tecido adiposo (Eberlé et al., 2004). Assim, os tecidos lipogênicos, incluindo tecido adiposo branco, glândula mamária e fígado, expressam as enzimas-chaves para síntese de ácido graxo. A ACC1 (*acetyl-CoA carboxylase 1*) converte acetil-CoA em malonil-CoA, etapa limitante na síntese de ácidos graxos (Abu-Elheiga et al., 1995), enquanto a FAS (*fatty acid synthase*) é o complexo enzimático multifuncional responsável pela síntese endógena de ácido graxo a partir dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA. Nesse processo, o palmitato (ácido graxo saturado de 16 carbonos) é sintetizado por sequências repetitivas de reações, nas quais cada molécula de malonil-CoA fornece dois carbonos (Smith, 1994).

Além do malonil-CoA gerado pela ACC 1 que é utilizado pela FAS para a síntese de ácidos graxos, existe o malonil-CoA gerado pela ACC2, que funciona como inibidor da CPT1 e da beta oxidação. Assim, embora a ACC1 seja expressa em todos os tecidos, ela é predominantemente expressa nos tecidos lipogênicos, enquanto a ACC2 é altamente expressa no coração, músculo esquelético e, em menor grau, no fígado (Wakil e Abu-Elheiga, 2009).

Embora em humanos e roedores o fígado seja o principal órgão lipogênico, em roedores, a síntese *de novo* e ácidos graxos pelo tecido adiposo é de

considerável importância (Hems et al., 1975; Bruss et al., 2010). Além disso, por não ser especializado no armazenamento lipídico, o fígado exporta para a circulação os lipídeos por ele sintetizados, na forma de lipoproteínas. Para o transporte dos lipídeos para o plasma, o fígado produz e secreta VLDL, lipoproteínas que contêm colesterol (COL) e são ricas em TG. Na circulação, as VLDL sofrem ação da LPL (Lipoproteína Lipase), que hidrolisa o TG e libera ácidos graxos para os tecidos extra-hepáticos (dentre eles músculo e adiposo), formando remanescentes de VLDL, as IDL. Parte das IDL é captada via receptores hepáticos específicos (LRP e receptor de LDL); o restante permanece na circulação e sua contínua metabolização pela LPL resulta nas LDL (Herz et al., 1988). As LDL são, portanto, lipoproteínas pobres em TG e ricas em COL, removidas da circulação via receptores de LDL amplamente expressos em tecidos em proliferação, tecidos esteroidogênicos (gônadas e adrenal) e fígado (Brown e Goldstein, 1986).

O mecanismo de captação celular de ácidos graxos é complexo e sofisticado, incluindo as etapas de dissociação do ácido graxo da albumina, transporte através da membrana (passivo e facilitado), ligação a proteínas intracelulares, formação do acil-CoA e esterificação (Begriche et al., 2006).

Acredita-se que a captação de ácidos graxos pelas células envolva dois mecanismos, o de difusão passiva através da membrana plasmática e o mediado por proteínas transportadoras (Hamilton et al., 1999). Já foram identificados vários transportadores de membrana chamados FAT/CD36 (*fatty acid translocase*), FABP (*fatty acid biding protein*) e FATP (*fatty acid transport protein*) (Pohl et al., 2004). A FAT/CD36 e FABPm são proteínas de ligação a ácidos graxos

associadas à membrana, que facilitam o transporte de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) por promover seu acúmulo na membrana. A deleção de FAT/CD36 protegeu camundongos da obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Qiao et al., 2008) e sua inibição está relacionada à redução na captação de AGCL (Pohl et al., 2005). As FATPs são consideradas transportadores reais envolvidos diretamente na translocação dos ácidos graxos através da membrana. Estes transportadores são bastante expressos em hepatócitos e adipócitos. Até o momento, seis membros da família FATP foram identificados, sendo que suas isoformas apresentam distribuição de tecido específica. Enguanto FATP1 é encontrada principalmente em tecido adiposo e coração, FATP5 é encontrada exclusivamente no fígado (para revisão veja Ehehalt et al., 2006 e Canbay et al., 2007). Camundongos que não expressam a FATP1 apresentam redução da captação basal de ácidos graxos e menores gotículas lipídicas no tecido adiposo marrom. Quando expostos a 4°C, embora haja elevação dos ácidos graxos plasmáticos, não há aumento da captação de ácidos graxos pelo tecido adiposo marrom, deixando-os incapazes de se defender do frio (Wu et al., 2006).

Para o seu armazenamento no tecido adiposo, os ácidos graxos captados ou sintetizados precisam ser esterificados. Nos adipócitos, o TG é estocado predominantemente no interior das gotículas lipídicas. Tais gotículas são cercadas por monocamadas de fosfolípides e são estabilizadas por proteínas, dentre as quais se destaca a perilipina A (Sawada et al., 2010). A perilipina A é ativada pela proteína kinase A (PKA) e tem papel essencial na regulação do metabolismo dos adipócitos (Brasaemale, 2007). A remoção da perilipina A do tecido adiposo branco aumenta a lipólise basal e reduz a lipólise estimulada pela PKA, além de

causar redução na massa adiposa (Tansey et al., 2001). Por outro lado, a superexpressão de perilipina A especificamente em adipócitos levou ao aumento do consumo de oxigênio, aumento da expressão de genes da beta-oxidação e produção de calor. Além disso, foi capaz de reduzir a expressão de genes da síntese lipídica e de RIP140, fator relacionado com a diferenciação de adipócitos brancos, causando também expressão ectópica de UCP1 em adiposo branco (Sawada et al., 2010).

A esterificação de ácidos graxos a TG depende do fornecimento de glicerol-3-fosfato (G3P), que pode ser proveniente da via glicolítica, da gliceroneogênese ou da fosforilação direta do glicerol pela enzima gliceroquinase (Hanson e Reshef, 2003). No tecido adiposo branco, a glicose é um precursor de grande importância para esterificação de ácido graxo e consequente acúmulo de lipídeos no tecido adiposo (Nelson e Lehninger, 2006), pois a atividade da gliceroquinase é muito pequena (Stryer, 1995; Rossi-Valentim et al., 2011).

A captação de glicose para o interior das células é mediada por carreadores protéicos denominados transportadores de glicose (GLUT). Os seis transportadores conhecidos (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5 e GLUT7) são expressos de forma tecido-específica. No tecido adiposo são expressos os GLUT1 e GLUT4, sendo o segundo dependente de insulina. Em situações em que a disponibilidade de glicose é limitada, como no jejum e em dietas restritas em carboidratos (Botion et al., 1995), o fornecimento de G3P para esterificação se dá pela gliceroneogênese (Hanson e Reshef, 2003). Esse processo é responsável pela síntese de glicerol a partir de intermediários como lactato, piruvato e alanina, sendo particularmente importante na re-esterificação que ocorre no tecido

adiposo. A gliceroneogênese envolve enzimas como piruvato carboxilase, alanina e aspartato aminotransferases, entretanto, considera-se como enzima chave a forma citosólica da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK-C) (Reshef et al., 1967; Gorin et al., 1969).

Sabe-se que a insulina estimula a lipogênese de várias maneiras: 1) aumenta a quantidade dos transportadores de glicose, GLUT-4, na membrana do adipócito, propiciando maior entrada de glicose e formação de G3P; 2) participa da síntese de novo de ácidos graxos por aumento da glicólise, da piruvato desidrogenase, da ACC e FAS; 3) estimula a LPL endotelial, aumentando a liberação de ácidos graxos dos TGs presentes no plasma para o tecido adiposo e 4) tem ação inibitória direta sobre a lipase hormônio sensível (HSL), impedindo a lipólise dos TG intracelulares (Oliveira, 2005).

Quando há demanda de energia pelo organismo, o tecido adiposo branco promove a hidrólise do TG e liberação de ácidos graxos e glicerol, processo denominado lipólise. Por mais de três décadas, a lipase hormônio sensível (HSL) foi considerada a única enzima limitante no processo de lipólise (Zechner et al., 2009). Classicamente, agonistas β-adrenérgicos, via proteína G, elevam os níveis de AMP cíclico, promovendo a ativação da proteína quinase A (PKA). A PKA, por sua vez, fosforila a HSL e a perilipina A. A fosforilação da HSL causa sua translocação do citosol para a gota lipídica, onde se inicia a hidrólise de triacilgliceróis (Holm, 2003).

Estudos com camundongos *knockout* para HSL demonstraram que a lipólise não depende exclusivamente dessa enzima, pois os animais não se tornaram obesos nem apresentaram sobrepeso (Okazaki, et al., 2002; Harada et al., 2003).

Em 2004, 3 grupos independentes descobriram uma nova enzima capaz de hidrolisar TG, a desnutrina ou ATGL (adipose triglyceride lipase) (Zimmermann et al., 2004; Villena et al., 2004; Jenkins et al., 2004). Atualmente, sabe-se que três enzimas são importantes na hidrólise de TG: a HSL, a monoacilglicerol lipase (MGL), descoberta há mais de 40 anos, e a recentemente identificada ATGL (Zechner et al., 2009). Segundo Langin (2006), a HSL é a principal lipase na lipólise estimulada por catecolaminas, enquanto a ATGL medeia a hidrólise de TG principalmente durante a lipólise basal. Também já foi demonstrado que a lipólise basal não é afetada em animais knockouts de HSL (Okazaki, et al., 2002) e que a ATGL não é fosforilada pela PKA (Zimmermann et al., 2004). Em 2009, um dos grupos que descobriu a desnutrina/ATGL demonstrou que por aumentar a lipólise, a superexpressão de ATGL especificamente em tecido adiposo promove redução do conteúdo de TG nos adipócitos, atenuando a obesidade induzida por dieta (Ahmadian et al., 2009). Posteriomente, foi demonstrado que a ATGL é essencial para o fenótipo do tecido adiposo marrom, uma vez que sua falta no tecido adiposo marrom modula o perfil de expressão gênica e o converte em fenótipo de adiposo branco, prejudicando sua capacidade termogênica (Ahmadian et al., 2011).

Beta-oxidação de ácidos graxos e termogênese

Os ácidos graxos são captados pelos tecidos e, uma vez dentro da célula, podem sofrer beta-oxidação, fornecendo energia para a célula. O processo de beta-oxidação ocorre dentro da mitocôndria, e para isso o ácido graxo precisa ser internalizado. Primeiramente, os ácidos graxos são ativados a acil-CoA pela acil-

CoA sintetase. A molécula de acil-CoA pode então ser transferida para a mitocôndria por um sistema composto de três proteínas: CPT1 (*Carnitine palmitoyltransferase* 1), CACT (*carnitine acylcarnitine translocase*) e CPT2 (*Carnitine palmitoyltransferase* 2). Nesse sistema, a CPT1 converte o acil-CoA em acilcarnitina, a CACT transporta a acilcarnitina através da membrana mitocondrial e, finalmente, já na matriz, as acilcarnitinas são novamente convertidas a acil-CoA pela CPT2 (McGarry e Brown, 1997).

No interior da mitocôndria, o acil-CoA entra no processo catabólico de betaoxidação, no qual sofre remoções sucessivas de unidades de dois átomos de carbono, promovendo a formação de acetil-CoAs que entrarão no ciclo do ácido cítrico. Esses processos resultam na formação de carreadores de elétrons reduzidos (FADH₂ e NADH), que são então oxidados na cadeia respiratória. A passagem dos elétrons doados pelas coenzimas FAD e NAD⁺ na cadeia respiratória gera um gradiente de prótons através da membrana interna da mitocôndria, e a enzima ATP sintetase utiliza a energia desse gradiente para fosforilar ADP formando ATP. Alternativamente, a formação de ATP se reduz quando o gradiente de prótons é dissipado pelas proteínas desacopladoras (UCPs - uncoupling proteins). Pode-se dizer, assim, que a respiração (transferência de elétrons através da cadeia respiratória para o oxigênio) foi desacoplada da produção de ATP. A primeira UCP descrita foi inicialmente chamada de termogenina, e posteriormente denominada UCP1. Ela é abundantemente expressa em tecido adiposo marrom e responsável pela dissipação do gradiente de prótons gerando calor ao invés de ATP neste tecido e conferindo-lhe alta capacidade termogênica (Gimeno et al., 1997). Na sequência, proteínas

estruturalmente homólogas foram identificadas, estando presente em vários tecidos (Fleury et al., 1997) e também em plantas e micro-organismos (Vercesi et al., 2006). Embora, as UCP2 e UCP3 pareçam promover algum grau de vazamento de próton, suas funções fisiológicas parecem estar mais ligadas ao controle do balanço redox celular do que à produção de calor (Laskowski e Russell, 2008; Kowaltowski et al., 2009). O termo clássico *nonshivering thermogenesis* se refere à adaptação dos mamíferos ao frio crônico (semanas) (Cannon e Nedergaard, 2010), o qual é dependente da atividade da UCP1 presente no tecido adiposo marrom.

Em adipócitos marrons maduros, a norepinefrina (NE) interage com todos os tipos de receptores adrenérgicos, sendo o beta 3 o mais expressivo e responsável pela via da termogênese e lipólise. Além disso, a NE promove a proliferação de pré-adipócitos, a diferenciação em adipócitos maduros, inibe a apoptose e regula diretamente a expressão gênica da UCP1 (Cannon e Nedergaard, 2004).

Acredita-se que a termogênese dependente da UCP1 seja um poderoso sistema para oxidação do excesso de gordura e redução da obesidade (Kozak et al., 2010). Já foi demostrado que parte do efeito da leptina sobre a redução de peso ocorre por meio da UCP1. Verificou-se que em camundongos tratados com leptina e comparados a controles com alimentação pareada (*pair-fed*), a redução de peso induzida pela leptina é totalmente dependente da UCP1, uma vez que esse protocolo exclui a ação da leptina na redução da ingestão (Commins et al., 2001). Além disso, a indução de leptinemia crônica em camundongos deficientes em UCP1 promoveu redução de ingestão, mas não aumentou o gasto energético

nem reduziu gordura corporal como nos controles selvagens, confirmando a ação da leptina sobre a UCP1 (Okamatsu-Ogura et al., 2007).

Proteínas e fatores que regulam a função dos adipócitos

Muitas são as proteínas capazes de alterar os processos de lipogênese e lipólise do adipócito. A AMPK (AMP-activated protein kinase) é considerada um sensor de energia celular (Kahn et al., 2005). Uma vez ativada, a AMPK alterna as funções celulares de anabolismo, como síntese de colesterol, ácidos graxos, triglicérides e proteínas, para funções catabólicas, como glicólise e oxidação de ácidos graxos. Sua ativação parece ter a capacidade de reduzir a lipogênese por inibir diretamente a ACC e os fatores de transcrição ChREBP (carbohydrate response element binding protein) e SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein-1c) (Hardie, 2005). Além disso, parece também regular positivamente a expressão protéica de FAT/CD36 e FABP (Chabowski et al., 2007). A regulação da AMPK tem sido bastante estudada, e verificou-se que situações de jejum (Daval et al., 2005; Sponarova et al., 2005), exercício (Park et al., 2002; Watt et al., 2006), e exposição ao frio (Mulligan et al., 2007; Bauwens et al., 2011) promovem sua ativação no adiposo branco. Além disso, agonistas betaadrenérgicos levam ao aumento da atividade da AMPK em adipócitos (Gaidhu et al., 2010), sugerindo que, além do AMP, o AMPc também esteja envolvido na sua ativação. O papel da AMPK na regulação da lipólise ainda é controverso. Enquanto alguns estudos demonstram efeito inibitório (Daval et al., 2005; Anthony et al., 2009), outros apresentam o oposto (Yin et al., 2003; Koh et al., 2007). Estudo com adipócitos e in vivo evidenciaram que a AMPK ativa a ATGL,

aumentado sua atividade lipolítica, fornecendo ácidos graxos para oxidação e indução da termogênese pela UCP1 (Ahmadian et al., 2011). Embora uma função antilipolítica da AMPK pareça contraditória, sugere-se que a ativação da AMPK como consequência da lipólise tenha o propósito de limitar a hidrólise de TG (Ceddia et al., 2013).

Vários fatores e cofatores atuam no metabolismo lipídico, diferenciação e função do adipócito. Além dos classicamente conhecidos como os PPARs (*peroxissome proliferator activated receptors*), outros vêm ganhando destaque.

Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligantes e, quando ativados, formam heterodímeros com o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR). O heterodímero liga-se então aos elementos responsivos (PPREs) na região promotora dos genes alvos, alterando sua velocidade de transcrição (Schoonjans et al., 1997; Fruchart et al., 1999). As isoformas de PPARs (α , $\beta/\delta \in \gamma$) exibem padrões de expressão tecido-específicos e participam da homeostase e metabolismo lipídicos de diferentes maneiras, dependendo dos genes que modulam (Staels et al., 1997; Schoonjans et al., 1997).

O PPARα é expresso em tecidos como fígado, coração e intestino delgado (Mandard et al., 2004). O PPARα é expresso em nível muito superior no tecido adiposo marrom do que no branco (Ahmadian et al., 2011). O PPARα regula primariamente vias catabólicas do metabolismo lipídico, por modular genes envolvidos na captação e oxidação de ácidos graxos, na lipólise, na lipogênese e no metabolismo do glicerol (Mandard et al., 2004). Já foi demonstrado que o PPARα ativa o promotor do gene da UCP1 (Barbera et al., 2001). Além disso, camundongos que não expressam PPARα (*null*) apresentam redução na

expressão de UCP-1, CIDEA (*Cell death-inducing fragmentation factor-\alpha-like effector a*), COX (ciclooxigenase), COX e CPT1 no tecido adiposo marrom, tornando-os incapazes de manter a temperatura corpórea quando expostos ao frio (Ahmadian et al., 2011).

O PPARγ, por sua vez, é bastante expresso nos tecidos adiposos branco e marrom (Knouff e Auwerx, 2004), sendo importante na regulação da expressão de genes participantes do anabolismo e armazenamento de lipídios e diferenciação de adipócitos (Michalik e Wahli, 1999).

Ο controle transcricional em linhagens de adipócitos tem sido extensivamente estudado (Rosen e Spiegelman 2000; Sellayah et al., 2011; Ohno et al., 2012). Demonstrou-se que, uma vez que o pré-adipócito tenha sido comprometido com a linhagem adipogênica, a cascata de sinalização promove sua diferenciação a adipócito maduro (Rosen e Macdonald, 2006). As proteínas C/EBPs (CCAAT enhancer binding proteins) são essenciais nessa cascata. Estímulos adipogênicos como AMPcíclico e glicocorticoides ativam C/EBPß e C/EBPo, promovendo a diferenciação terminal de pré-adipócitos comprometidos. C/EBP β e C/EBP δ induzem a expressão de C/EBP α (Rosen e Macdonald, 2006), de forma que camundongos que não expressam C/EBPß e C/EBPδ são desprovidos de tecido adiposo (Tanaka et al., 1997).

Destaca-se também nesse processo o PPARy, que exerce importante papel na diferenciação tanto dos adipócitos brancos quanto dos marrons. Contudo, a expressão de PPARy em células mesenquimais promove a indução a adipócitos brancos e não ao fenótipo de adiposo marrom (Kajimura et al., 2008). Além disso, o PPARy regula e é regulado por C/EBP. Juntos, esses fatores representam um

loop transcricional que mantém estável o estado de adipócitos já diferenciados (Rosen et al., 2002). Paralelamente, sabe-se que a introdução de PPARγ mutado em linhagem de células 3T3-L1 reduz a expressão de genes chaves para a função do adipócito, como GLUT4 e enzimas envolvidas no metabolismo de TG e ácidos graxos (Tamori et al., 2002)

Outro fator importante, o PGC1 α (*PPARy-coativator-1* α), é altamente induzido pelo frio em tecido adiposo marrom de camundongos. Nesse contexto, o PGC1 α ativa genes termogênicos do adiposo marrom como UCP1 e Dio2 (*Type 2 deiodinase*) (Tiraby et al., 2003).

Nota-se, então, que existem vários fatores relacionados com a transcrição e determinação do fenótipo de adiposo marrom. Entretanto, a busca por um fator definitivo e exclusivo na diferenciação a adipócito marrom ainda não havia sido encontrado. Mais recentemente foi identificado que o PRDM16 tem função essencial na indução do fenótipo de adiposo marrom. PRDM16 ativa o padrão genético de tecido adiposo marrom e suprime o de tecido adiposo branco, direcionando a linhagem de adipócitos brancos à marrom (Seale et al., 2007). Definido como um fator de transcrição do tipo dedos de zinco, o PRDM16 determina o destino da célula precursora para músculo ou adipócito marrom. Para a adipogênese marrom, o PRDM16 se liga ao PPARy ativando sua função transcricional (Seale et al., 2008). Os PRDMs têm se destacado como importantes fatores no desenvolvimento, diferenciação e doença, sendo reguladores transcricionais de tecidos específicos. A família é definida pela presença do domínio PR e contém inúmeros membros cuja desregulação vem sendo associada ao câncer e outras doenças (Fog et al., 2012).

Outra proteína tem sido relacionada ao desenvolvimento do tecido adiposo, o RIP140 (receptor-interacting protein-140), uma proteína predominantemente nuclear. Evidências apontam o RIP140 como corregulador transcricional com papel central em tecidos metabólicos. O RIP140 se liga e reprime determinados receptores nucleares como PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), TRs (thyroid hormone receptors) e ERRs (estrogen-related receptors) (revisado por Fritah et al., 2012). Além de exercer papel repressor, foi demonstrado que o RIP140 pode agir como coativador. Herzog et al. (2007) demonstraram que RIP140 e LXR são recrutados simultaneamente pelos elementos responsivos a LXR, promovendo a regulação positiva do gene da FAS de maneira dosedependente. Os autores concluem que, no fígado, embora o RIP140 tenha papel correpressor na gluconeogênse, atua como coativador da lipogênese. A deleção genética de RIP140 (RIP140-null mice) promove proteção contra obesidade e esteatose hepática induzidas por dieta hiperlipídica (Leonardsson et al., 2004). Na falta de RIP140, o tecido adiposo branco adquire características de marrom, com aumento da expressão da UCP1. Por outro lado, a superexpressão de RIP140 leva à redução da expressão de genes do transporte e oxidação de ácidos graxos (Fritah et al., 2010). Contudo, ainda não está clara a amplitude da importância do RIP140 no desenvolvimento do tecido adiposo marrom. Ainda que seu papel seja conhecido, a deleção do RIP140 (null mice) não eliminou a resposta do tecido ao estímulo pelo receptor beta3-adernergico (Hudson-Davies et al., 2009).

Proteína de transferência de colesteril éster (CETP) e adiposidade

A CETP é uma glicoproteína de 74 kDa expressa em diversos tecidos, incluindo o tecido adiposo, e especialmente no fígado (Drayna et al., 1987). Radeau et al. evidenciaram que, nos humanos, a CETP é bastante expressa em tecido adiposo (1998), e que sua expressão é maior em adipócitos pequenos e com menor quantidade de gotículas lipídicas (1995).

A CETP tem papel central no remodelamento de lipoproteínas plasmáticas, alterando a composição química e a distribuição de colesterol nestas lipoproteínas (Bruce et al., 1998; Tall, 1995). Uma vez secretada para a circulação sanguínea, a CETP promove, de maneira não equimolar, a transferência de colesterol esterificado (CE) das HDL para as LP que contêm apo B (quilomicrons, VLDL e LDL) em troca de TG (Tall, 1993; Oliveira e Quintão, 1996). A CETP é expressa em várias espécies, incluindo primatas, coelhos, hamsters, répteis e peixes; enquanto camundongos e ratos não a expressam (Ha & Barter, 1982).

Estudos sobre estrutura e função da CETP evidenciam que ela se conecta a duas lipoproteínas, formando um túnel hidrofóbico e permitindo a transferência de lípides neutros entre as lipoproteínas (Qiu et al., 2007). Como resultado, a CETP participa do catabolismo da HDL, promovendo uma redução de HDL-colesterol e, portanto, um aumento de risco de desenvolvimento de doenças ateroscleróticas. Assim, a CETP parece desempenhar papel aterogênico, pois se considera que o risco para DVC está diretamente relacionado à concentração plasmática de LDL-colesterol e inversamente à concentração plasmática de HDL-colesterol (Huuskonen, 2000; Pedersen, 2000; Assmann, 2001). No entanto, em alguns contextos metabólicos, como hipertrigliceridemia (Hayek et al., 1995) e castração

(Cazita et al., 2003; Casquero et al., 2006), dentre outros (Foger et al., 1999; Kako et al., 2002; Berti et al., 2005), a CETP apresenta papel protetor na aterogênese.

A inibição farmacológica da CETP com o objetivo de elevar HDL-colesterol e assim reduzir risco de doença coronariana tem sido postulada como terapia antiaterogênica (Okamoto, et al., 2000; Huang et al., 2002; Barter et al., 2003, Clark et al., 2004; Brousseau et al., 2004). O primeiro inibidor da CETP a entrar em fase III de estudo foi o torcetrapib. O tratamento com torcetrapib, porém, elevou significativamente a mortalidade por diferentes causas, incluindo hipertensão, sepsis e câncer. Como consequência do aumento da mortalidade em indivíduos tratados com torcetrapib, determinou-se a suspensão do "Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events" (ILLUMINATE), com mais de 15000 pacientes nos EUA (Clark, 2006; Pearson, 2006; Tall, 2007). Estudos clínicos e com modelos animais sugerem que o aumento de mortalidade reportado com torcetrapib poderia ser um efeito específico da molécula da droga, independente do efeito da inibição da CETP. Além disso, outros três inibidores da CETP (dalcetrapib, anacetrapib e evacetrapib) foram avaliados e, em fase I e II, não alteraram a pressão arterial ou os níveis de aldosterona (Ghosh e Ghosh, 2012). Mesmo assim, o estudo clínico com dalcetrapib foi recentemente suspenso por falta de benefício (Goldberg e Hegele, 2012). Os outros dois inibidores - Anacetrapib e Evacetrapib - estão atualmente em fase III e têm previsão de se obterem resultados sobre efeito na DCV para 2017 (Bochem et al., 2013).

Além de sua ação no transporte de lipídeos entre as lipoproteínas, alguns estudos investigam o papel intracelular da CETP. Já foi demosntrado que a
expressão da CETP contribui para a homeostasia normal do colesterol nos adipócitos (Izem e Morton, 2001). Segundo Izem e Morton (2007) a CETP não secretada para a circulação seria responsável pela transferência de lipídeos entre organelas, sendo responsável pelo transporte do TG e CE (colesteril éster) recémsintetizados no retículo endoplasmático, para serem estocados na gotícula lipídica, onde também estão presentes as lipases. Assim, de acordo com seus resultados, células deficientes em CETP (células SW872 com expressão da CETP suprimida por oligonucleotídeo antissenso) apresentam acúmulo de TG e CE no retículo endoplasmático, levando ao armazenamento anormal de lipídios e prejudicando o metabolismo lipídico da célula.

Outro estudo mostrou que a expressão da CETP nas células, e não no meio de cultura, promove o efluxo de colesterol, sugerindo atuação da CETP na etapa inicial do transporte reverso de colesterol (TRC) (Zhang et al., 2001)

Por meio de sua ação na troca de lipídeos neutros, a CETP parece ter outras funções além de sua ação no TRC (Oliveira e de Faria, 2011). Estudos mostram que no Alzheimer a redução da atividade da CETP retardaria o surgimento dos sintomas de demência (Rodríguez et al, 2006; Sanders et al, 2010). Entretanto, tal relação ainda parece controversa (Arias-Vásquez et al, 2007; Fidani et al, 2004). E, embora sem consenso, alguns trabalhos relacionam também a CETP com longevidade (Barzilai et al, 2003; Koropatnik et al, 2008; Hirano et al, 1997; Arai et al, 2003; Cellini et al, 2005; Capri et al, 2006).

Como a CETP faz parte de uma superfamília de proteínas anti-inflamatórias, com membros como a LBP (*lipopolissacaryde binding protein*) e BPI (*Bactericidal permeability increasing protein*), a ação da CETP no processo inflamatório

também tem sido estudada. Cazita et al. (2008) demonstraram que os camundongos transgênicos para CETP humana apresentam maior taxa de sobrevivência e liberam menos TNFa e IL-6 quando expostos a LPS (lipopolissacárides de parede bacteriana) que seus controles não transgênicos. Outro grupo demonstrou uma correlação positiva entre CETP plasmática e sobrevida de pacientes com sepsis internados em unidade de terapia intensiva (Grion et al, 2010).

Em 2007, nosso grupo demonstrou que a expressão de CETP é capaz de reduzir a obesidade induzida por dieta em camundongos hipertrigliceridêmicos, transgênicos para a apolipoproteína CIII (Salerno et al., 2007). Este trabalho revelou uma função antiadipogênica inédita desta proteína. Também em nosso laboratório, verificamos que camundongos transgênicos que expressam a CETP, sob dieta padrão pobre em gordura (chow), apresentam menor adiposidade e concentrações plasmáticas de leptina reduzidas (Tese de Doutorado de P. R. Patrício, 2010). Nesse estudo, camundongos machos e fêmeas transgênicos para a CETP e seus controles foram acompanhados desde o desmame (1 mês) até 5 meses de idade. Os camundongos CETP possuíam menores quantidades de gordura que os controles, sendo esta diferença mais marcante nas fêmeas, tanto em termos absolutos quanto relativos ao peso corpóreo. Verificou-se também redução na área média dos adipócitos em relação aos NTg (~50%). Tais achados foram atribuídos à expressão diferencial de genes no tecido adiposo, uma vez que a CETP levou à alteração de expressão de genes lipogênicos e lipolíticos. Foram encontrados redução de SREBP2 e LPL e aumento de AMPK no depósito perigonadal, e redução de PPARy e aumento da HSL e da AMPK no depósito

subcutâneo. A fim de confirmar que os achados eram de fato resultados da expressão da CETP e não uma possível consequência da inserção aleatória do transgene no genoma do animal, analisou-se o efeito da inibição da CETP em um modelo animal que expressa naturalmente a CETP. A atividade da CETP em *Golden Syrian* hamsters foi então inibida com a administração subcutânea de anticorpo monoclonal contra a CETP (TP2). A inibição da atividade da CETP durante um mês causou maior ganho de peso, aumento da massa adiposa e da área dos adipócitos.

Vários são os possíveis mecanismos pelos quais a CETP poderia promover redução de adiposidade. Nesse sentido, são necessários estudos adicionais do metabolismo lipídico e função dos adipócitos na ausência e presença da CETP.

Modelo animal

Em humanos e em outras diferentes espécies, a CETP participa do transporte reverso de colesterol, tendo grande importância no remodelamento das lipoproteínas e no perfil lipêmico. Camundongos e ratos, no entanto, não a expressam (Ha & Barter, 1982); assim, camundongos transgênicos para CETP se tornaram importantes ferramentas no estudo da regulação e função dessa proteína.

A linhagem de camundongos transgênicos usada nesse estudo foi desenvolvida no Departamento de Medicina da Universidade de Columbia (Nova York), pelo grupo do Professor Dr. Alan Tall. Denominada 5203, a linhagem foi gerada em camundongos com *background* C57BL/6 pela inserção de minigene da

CETP, ligada à região promotora natural do gene humano da CETP (Jiang et al. 1992).

O padrão de expressão de RNAm de CETP nos tecidos desses animais é semelhante ao dos humanos, sendo principalmente detectados em fígado, baço, intestino delgado, rins e tecido adiposo. Isso sugere que o transgene contenha os principais elementos regulatórios que determinam a expressão em tecidos humanos. Além disso, quando tratados com dieta rica em colesterol, há um aumento significativo da expressão da CETP, levando a um aumento da massa e atividade da CETP no plasma.

Em estudo adicional, Jiang et al. (1993) verificaram que os camundongos da linhagem 5203 (heterozigotos) apresentavam cerca de 5 ug/ml de CETP no plasma, o que resultava em alterações nos lípides plasmáticos. Conforme esperado, a expressão da CETP levava à redução dos níveis de colesterol total, mas a nenhuma alteração no TG ou fosfolípides plasmáticos. Além disso, foi verificado aumento de VLDL-Col e LDL-Col, acompanhado de redução de HDL-Col, resultado coerente com a ação da CETP no plasma.

Também ja foi verificado que tanto em dieta hiperlipídica (Salerno et al., 2007) quanto em dieta comercial padrão (Tese de doutorado de P. R. Patrício, 2010) a expressão da CETP nesses camundongos não altera insulinemia, glicemia ou ácidos graxos não esterificados.

OBJETIVOS

Investigar os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela redução da adiposidade em camundongos CETP transgênicos em relação aos controles (que não expressam CETP) na vigência de dieta pobre em gordura. Para tanto, avaliamos os processos de captação e retenção de ácidos graxos e glicose, síntese de novo de lípides (lipogênese) e lipólise no tecido adiposo dos animais controles e transgênicos. Além disso, investigamos a modulação da expressão de genes e proteínas relacionadas com esses processos no tecido adiposo branco e marrom.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais Transgênicos (Tg)

Todos os animais gerados para estes estudos foram derivados de animais gentilmente fornecidos pelo Dr. Alan Tall da Divisão de Medicina Molecular da Columbia University, NY, E.U.A. em 1996. As linhagens são mantidas no biotério da Dra. Helena C. F. de Oliveira, no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Área de Fisiologia e Biofísica- IB - UNICAMP, Campinas. Foram utilizados camundongos transgênicos (*background* C57BL/6) para o gene humano da CETP, sob regulação da região promotora natural, linhagem 5203 (Jiang et al. 1992). Os animais foram tipados segundo seus respectivos fenótipos: atividade da CETP no plasma (>15% nos Tg e < 5% nos não-Tg). Neste projeto, os experimentos foram realizados com fêmeas, uma vez que nos achados anteriores do nosso grupo os dados das fêmeas mostraram maior relação dos genótipos com a adiposidade.

Tratamento dos animais

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CCEA-IB-UNICAMP) (protocolo n° 1607-1) e está inserido no contexto do projeto CIBio 2008/02 aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio/IB/Unicamp).

Os camundongos foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2°C), luminosidade (ciclos de claro e escuro de 12 horas), recebendo água e ração (Nuvital CR1, Colombo, Brasil) *ad libitum*. A dieta era

composta por 23% de proteína, 4,5% de gordura total, 33% carboidratos e 21% de fibra, no total de 263 Kcal/100 g (dieta *chow*). Os animais CETP e seus controles não transgênicos foram mantidos em dieta *chow* do desmame aos 5 meses de idade.

Atividade da CETP no plasma

Para o screening dos animais da colônia CETP analisou-se a atividade da CETP no palsma. Uma mistura de VLDL+LDL foi obtida por ultracentrifugação de plasma de doadores humanos normolipidêmicos e utilizada como lipoproteínas aceptoras. HDL também obtida por ultracentrifugação de plasma de doadores normolipidêmicos foi marcada radioativamente com ¹⁴C-colesteril-éster (¹⁴CCE) de acordo com Oliveira & Quintão (1996). O ensaio isotópico consistiu em uma reação contendo 50 µg de proteína de VLDL+LDL, 10000 dpm de ¹⁴CCE-HDL e 5 µl do plasma fonte de CETP, em um volume final de reação de 100 µl. A mistura foi incubada a 40°C por 4 horas, permitindo a ação da CETP, que transferiu o colesteril éster marcado da HDL para VLDL+LDL. Em seguida, foram adicionados à mistura 400 µl de tampão TSE (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH7,5, EDTA 1 mM pH 8,0) e 50 µl de coquetel de precipitação das lipoproteínas que contém apoB (partes iguais de sulfato de dextrana 1,6% e MgCl₂ 1,0 M). Esperou-se 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram então centrifugadas a 2800 rpm por 30 minutos a 10°C, garantindo que todas as lipoproteínas que contêm apoB, juntamente com o colesteril éster marcado que foi transferido, precipitassem e apenas a HDL fosse recuperada no sobrenadante. Foram então misturados 450

µl do sobrenadante a 3 ml de solução cintiladora aquosa (ACS NACS104, GE Healthcare-Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) para determinação da radioatividade remanescente nas HDL em contador beta Beckman LS 6000AT (Fullerton, Califórnia, EUA). No ensaio foram utilizados sempre 2 *blanks* (tubos com tampão), 3 controles-negativos (tubos com plasma de camundongo não transgênico) e 2 controles-positivos (plasma de camundongos transgênicos). Todas as amostras foram feitas em duplicatas, e os resultados expressos como % de ¹⁴CCE transferido da HDL para as VLDL+LDL:

% CE transferido = 100 - (A / C * 100)

onde, A = média em dpm das duplicatas das amostras

C = média em dpm das duplicatas dos controles-negativos

Análises bioquímicas

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

Análise da composição da carcaça

Para análise da composição da carcaça (água, massa magra e massa gorda), as carcaças foram desidratadas a 65°C até ficarem com peso constante (peso seco). A gordura total da carcaça foi extraída com éter de petróleo

(LabSynth, SP, Brazil) utilizando extrator soxhlet por cerca de 96 horas. O cálculo da massa gorda é dado pela subtração do peso da carcaça desidratada antes e depois da extração lipídica.

Lipogênese *in vivo*

Com os animais devidamente identificados e pesados, foi injetado intraperitonialmente 20 mCi de água triciada diluída em solução salina 0,85% (Osono e col, 1995). Após uma hora, os animais anestesiados sofreram exsanguinação retro-orbital. O plasma foi obtido para controle da radioatividade (10 µL) em contador Beta e os tecidos (fígado, tecido adiposo subcutâneo e visceral (perigonadal + perirrenal) foram coletados e pesados. Os fígados foram divididos e processados em duplicata, porém os depósitos adiposos foram processados em simplicata, devido à pequena quantidade de amostra. Os lipídeos das amostras foram extraídos de acordo com o protocolo proposto por Folch (1957). Resumidamente, foram adicionados 5 ml de metanol e 10 ml de clorofórmio às amostras. Após permanecerem em temperatura ambiente por longo período (overnight), as amostras foram filtradas e adicionou-se 3,5 ml de água. Após centrifugação, a fase inferior, contendo os lipídeos, foi aspirada e submetida a secagem completa. O extrato seco foi então redissolvido em 3 mL da solução cintiladora para contagem de sua radioatividade, permitindo a determinação da lipogênese (incorporação de água triciada em lípides totais). O cálculo utilizado para obtenção da quantidade de ³H₂O incorporada em lipídeos foi baseado nas duas fórmulas seguintes:

1- Atividade específica do plasma, AE= cpm/μL plasma x 18/1000, e

2- μ mol ³H₂O incorporado em lipídeos = cpm amostra/ AE x 1/tempo x 1/massa de tecido.

Captação de glicose em fígado, tecidos adiposos e músculo (in vivo)

Após 12 horas de jejum, os animais receberam injeção intraperitoneal contendo glicose (2g/Kg massa corporal) e ³H-deoxiglicose (150 μ Ci/Kg massa corporal) (Cooney, 1985). Amostras de plasma foram coletadas nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, quando também foi aferida a glicemia. Aos 120 minutos, os animais foram anestesiados e sacrificados por exanguinação. Os tecidos (fígado, músculo (gastrocnemio + solio) e adiposos perigonadal, perirrenal, subcutâneo e marrom interescapular) foram coletados e lavados em salina, para reduzir quantidade de sangue, que interferiria na contagem da atividade.

Os tecidos foram então solubilizados em composto digestivo (Tissue Solubilizer – GE Healthcare-Amersham). Acrescentou-se líquido de cintilação para amostras não aquosas (GE Healthcare-Amersham) para posterior contagem da radiação ionizante em contador beta (Bekmam - LS 6000TA).

O "quench" produzido pela cor das amostras foi corrigido por adição de 1000 CPM de ³H-Trioleína, permitindo correção proporcional.

Retenção de ácidos graxos pelo fígado, tecido adiposo e músculo (in vivo)

Após 8 horas de jejum, os animais receberam trioleína marcada com trício (3H-TO) (5 uCi e 180 mg/animal) por via oral. Vinte e quatro horas depois da administração orogástrica, os animais foram anestesiados e sacrificados por

exsanguinação total para coleta dos tecidos (fígado, músculo gastrocnêmio e depósitos visíveis de gordura perigonadal e subcutânea). Os tecidos (100 a 500 mg) foram usados para extração da gordura por Folch (1957). Após a evaporação do solvente foram adicionados 3 ml de líquido de cintilação em amostras não aquosas (GE Healthcare-Amersham) para posterior contagem da radiação ionizante em contador beta (Bekmam - LS 6000TA).

Foi realizado um balanço de gordura antes (três dias) e após (24 horas) a administração oral aguda de trioleína (³H-TO). As fezes foram coletadas e a ingestão de ração quantificada. Amostras de fezes e ração foram secas em estufa e submetidas à extração de gorduras de acordo com protocolo de Folch (1957), fornecendo a quantidade de gordura ingerida e excretada nas fezes (gravimetria).

Isolamento adipócitos

Para os experimentos *in vitro* foram utilizados adipócitos isolados mediante a técnica de digestão de tecido por colagenase, descrita por Rodbell (1964) e adaptada para camundongos (Salerno et al., 2007). Para esses experimentos foram usados animais alimentados. Resumidamente, os coxins adiposos foram retirados, picados em finos fragmentos e incubados em tampão digestivo (Krebs-Ringer, 3% BSA, 6 mM glicose, colagenase II 1 mg/ml, pH=7,4) por 45 minutos a 37°C em banho-maria sob agitação. Em seguida, a amostra foi filtrada em malha fina (retendo restos teciduais não digeridos) e lavada por três vezes com 3 ml de tampão (Krebs-Ringer, 3% BSA, 6 mM glicose, sem colagenase) mantido a 37°C.

As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade verificada por azul de tripan.

Lipogênese a partir de acetato em adipócitos isolados

Os adipócitos (10^6 células) foram incubados em 1 ml de tampão Krebs-Ringer (3% BSA, 10 mM acetato, 6 mM glicose, 25 µU insulina humana) contendo 1 µCi de ¹⁴C-acetato por 2 horas , sob atmosfera de carbogênio (95% O₂/5% CO₂) a 37° C sob agitação constante. Após a incubação, a extração de lipídeos foi feita de acordo com o método de Dole (1960). A fase superior (contendo os lipídeos) é coletada submetida à secagem completa. O extrato seco foi então redissolvido em 3 mL da solução cintiladora para amostras não aquosas, para contagem de sua radioatividade, permitindo a determinação da lipogênese.

Lipólise em adipócitos isolados

Para o experimento de lipólise foi feita avaliação da atividade lipolítica dos adipócitos isolados frente a estímulo com agonista β-adrenérgico (isoproterenol), de acordo com Löfgren (2005) modificado. Um ml de suspensão celular (em tampão Krebs-Ringer, 3% BSA- livre de ácidos graxos, 6 mM glicose, pH=7,4) foi incubado por 5 min a 37°C em presença de adenosina deaminase (0,2 U/ml), para degradação da adenosina liberada no meio pelos adipócitos, impedindo sua ação antilipolítica (Fredholm, 1981; Honnor et al., 1985). Após esta etapa, os adipócitos foram incubados por 1h30m a 37°C com ou sem isoproterenol (10⁻⁵ M). O isoproterenol foi dissolvido em solução de ácido ascórbico 2%, para preservar sua

atividade. Entretanto, excesso de ácido ascórbico no meio inibe a reação enzimática do reagente para glicerol. Assim, primeiramente foi feita solução estoque de isoproterenol (1M) em 2% ácido ascórbico e, posteriormente uma solução de isoproterenol (10⁻³ M) em tampão. A reação foi bloqueada em banho de gelo e, após 10 minutos em repouso, as células flutuantes foram descartadas, e 400 ul do meio foram coletados e armazenados em -20°C para posterior dosagem de glicerol. A quantidade de glicerol liberada pelos adipócitos isolados para o meio de incubação foi determinada por kit enzimático-colorimétrico (Bioclin, Quibasa: Química básica. Belo Horizonte, Brasil). Os resultados foram expressos em mg/dL.10⁻⁶ células.

Lipólise in vivo

A lipólise *in vivo* foi analisada nos animais alimentados e após jejum de 12 horas. Consideraram-se como lipólise os valores obtidos com a dosagem de glicerol no plasma (kit enzimático-colorimétrico: Bioclin, Quibasa: Química básica. Belo Horizonte, Brasil). Para determinação da lipólise basal, coletou-se plasma antes da injeção de isoproterenol, enquanto a lipólise estimulada foi determinada 15 minutos após a injeção intraperitoneal com isoproterenol (0,3 mg/Kg massa corporal) (Osuga et al., 2000).

Respirometria indireta (VO₂, VCO₂, GET, QR)

A respirometria indireta foi feita em equipamento Oxylet System (Pamlab e Harvard Apparatus). Os camundongos foram adaptados à câmara por 15 minutos

por duas vezes e aclimatados por 10 minutos imediatamente antes de as medidas serem tomadas. Foram feitas duas medidas consecutivas de 5 minutos, entre 8 e 12 horas da manhã – em animais alimentados e após 12 horas de jejum. O software metabolism v2.2.01 forneceu os valores de consumo de oxigênio (VO₂), dióxido de carbono produzido (VCO₂), quociente respiratório (QR) e gasto energético total (GET). Os resultados foram normalizados pela massa dos animais.

Equações:



$$RQ = \frac{VCO_2}{VO_2}$$

GET = (3,815 + (1,232 x QR)) x VO₂ x 1,44

Onde: $[O_2]_e$ = concentração de oxigênio que flui pra dentro da gaiola

 $[O_2]_s$ = concentração de oxigênio dentro da gaiola

 $[CO_2]_e$ = concentração de dióxido de carbono que flui pra dentro da gaiola

 $[CO_2]_s$ = concentração de dióxido de carbono dentro da gaiola

F = ar que flui pra dentro da gaiola

Determinação de colesterol (COL) e triglicérides (TG) nos tecidos adiposos

Amostras dos tecidos adiposos (aprox. 50 mg) foram submetidas à extração de gordura por Folch (1957). Alíquotas de 100 ul foram secas em nitrogênio, o lipídio extraído foi ressuspendido em 200 ul de tampão à base de ácido cólico e triton, fornecido pelo Kit (Amplex Red Cholesterol Assay - Invitrogen). A determinação do conteúdo de COL foi feita por kit enzimático-fluorimétrico (Amplex Red Cholesterol Assay Kit - invitrogen), enquanto a dosagem de TG nos tecidos adiposos foi feita por kit enzimático-colorimétrico Roche Diagnostic GmbH (Mannheim, Germany).

Real time – PCR

RNA total foi extraído das amostras de tecido adiposo utilizadondo-se RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Germany), conforme orientações do fabricante.

A integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1,2% com tampão Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM, e revelado com brometo de etídio. A pureza e quantificação foram determinadas em espectrofotômetro Gene Quant (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia).

Para verificação de contaminação com DNA genômico, foi realizado PCR em 1 µg de RNA total, o que não deve resultar em nenhum produto de PCR. As amostras que apresentaram contaminação foram re-extraídas até completa descontaminação. Obteve-se o cDNA a partir de 2 µg de RNA total por transcrição reversa, usando-se kit da Applied biosystems (High-Capacity cDNA reverse transcription kit), de acordo com a bula.

A expressão gênica nos tecidos foi determinada por Real time PCR. Utilizouse SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) e sistema de detecção Step one Real time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) e pares específicos de primers (direto e reverso) mostrados no quadro abaixo. A quantificação foi feita pela medida do ciclo *threshold* normalizado pelo controle interno β-actina e expressa em relação aos controles não transgênicos.

Amplímetros utilizados na RT-PCR

Gene	amplímetros		Referência	
β-actina	direto	5` GGACTCATCGTACTCCTGCTT 3`	Norris et al. 2008	
	reverso	5` GAGATTACTGCTCTGGCTCCT 3`		
GAPDH	direto	5` CCT GCA CCA CCA ACT GCT TA 3`	Decenhade*	
	reverso	5` GCC CCA CGG CCA TCA CGC CA 3`		
ATGL	direto	5` TGTGGCCTCATTCCTCCTAC C 3`	Reid et al., 2008	
	reverso	5` TCGTGGATGTTGGTGGAGCT 3`		
AMPK	direto	5` GGATCGCCAAATTATGCAGCACC 3`	Gaidbu at al. 2010	
	reverso	5` AAGGGCATACAGGATGACACCACA 3		
CD36	direto	5` GGAACTGTGGGCTCATTGC 3`	Zhau 2000	
CD30	reverso	5` CATGAGAATGCCTCCAAACAC 3`	_ ZΠOU, ZUUδ	
CPT1	direto	5`AGTGACTGGTGGGAGGAATA 3`	Desenhade*	
GETT	reverso	5`CTTGAAGTAACGGCCTCTGT 3		
	direto	5` GCAGAAGACGCAGGAAGA 3`	Norria at al. 2009	
FAIPT	reverso	5` GGACGTGGCTGTGTATGG 3`		
GLUT1	direto	5` CCATCCACCACACTCACCACGC 3`	Desenhado*	
OLUTI	reverso	5` GCCCATAAGCACAGCAGCCACA 3`		
GLUT4	direto	5` ACATACCTGACAGGGCAAGG 3`	Montel Hagen 2008	
OLUIT	reverso	5` CGCCCTTAGTTGGTCAGAAG 3`		
ны	direto	5` ATGGATTTACGCACGATGACACAG 3`	Desenhado*	
TIOL	reverso	5` ACTGAGGCCTGTCTCG 3`		
PPARa	direto	5` GCA GCT CGT ACA GGT CAT CA 3	Zhang at al. 2012	
	reverso	5` CTC TTC ATC CCC AAG CGT AG 3`		
PPARy	direto	5` GGTGAAACTCTGGGAGATTC 3`	Desenhado*	
PPARy	reverso	5` CAACCATTGGGTCAGCTCTT 3`		
PGC1a	direto	5`CCTGACACGGAGAGTTAAAGGAA 3`	Desenhado*	
1 0010	reverso	5`GATGGCACGCAGCCCTAT 3`		
Perilinina	direto	5` GTACACTATGTGCCGCTTCC 3`	Pinent et al., 2011	
r onipilia	reverso	5` CTTTGCGCTCCGCCTCT 3`		
RIP140	direto	5` ATG GGT GTT GTC CCT TCC TC 3`	Sawada et al., 2010	
	reverso	5` AAC TGC TCG CTC TCT CGT TC 3`		
UCP1	direto	5` GAT GGT GAA CCC GAC AAC TT 3`	Sawada et al. 2010	
	reverso	5` CTG AAA CTC CGG CTG AGA AG 3`		
UCP2	direto	5` AGCATGGTAAGGGACCAGTG 3`	_ Desenhado*	
	reverso	5`CAGTTCTACACCAAGGCTC 3		

* com auxílio do software vector NTI 900 (Informax-invitrogen, Bethesda, MD).

Determinação proteica dos receptores beta 3-adrenérgicos

Foram extraídos os tecidos adiposos visceral, subcutâneo e marrom interescapular. Homogeneizados a 4°C em tampão contendo 250mM de sacarose, 50mM de Tris, 1mM EDTA (pH=7,4) e coquetel de inibidor de protease (2µl por mL). O material insolúvel foi removido por centrifugação a 10.000xg por 10min a 4°C. O sobrenadante então foi ultracentrifugado 100.000xg por 60 min a 4°C. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 50ul de tampão contendo 50mM de Tris, 1mM EDTA e coquetel inibidor de protease. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford. Amostras contendo 40ug de proteína foram adicionadas de tampão de Laemmli (4% SDS, 5% sacarose, 0,5% azul de bromofenol, 50mM de Tris pH=6,8, 10% β-mercaptoetanol) e corrido em gel de poliacrilamida 10% a 100V até sair o Laemmli do gel (3h). As proteínas foram eletrotransferidas para membrana de PVDF (GE healthcare / nº RPN303F) a 230mA por 12h. A efetividade da transferência foi verificada em ponceau com 1% de ácido acético. As membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução contendo 100mM de NaCl, 10mM de Tris-HCl, 0,1% Tween20 com leite desnatado 5% em temperatura ambiente, incubadas overnight com anticorpo anti-B3 AR (sc-1473; Santa Cruz Biotechnology) em 1% de albumina, diluído 1:500 e anticorpo segundário (goat) 1:10000 por 1h30m. Foi utilizado quimioluminescente (Super Signal West Pico) e a intensidade das bandas foi medida utilizando-se image quant LAS 4000.

Análises estatísticas

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). O número de animais usados em cada análise está indicado entre parênteses (n). Utilizou-se teste "t" de Student para comparações simples entre dois grupos. A significância estatística foi definida quando p \leq 0,05.

Resultados

O perfil lipêmico dos animais foi analisado para a caracterização dos grupos. Verificou-se que apenas os níveis de colesterol total estavam reduzidos no grupo CETP (**Tabela 1**), resultado esperado pelo próprio efeito da CETP, já previamente identificado, de reduzir HDL-colesterol (Agellon et al., 1991; Jiang et al., 1992). Os níveis de triacilgliceróis e ácidos graxos não esterificados (NEFA) não foram alterados pela expressão da CETP.

Tabela 1. Níveis plasmáticos de triglicérides (TG), colesterol (COL), ácidos graxos não esterificados (NEFA).

	NTg	CETP
COL (mg/dL)	92 ± 6	76 ± 5 *
TG (mg/dL)	93 ± 5	99 ± 8
NEFA (mmol/L)	$2,2 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$

Camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade (estado alimentado). Média ± epm (n= 7 por grupo). Teste "t" de Student, * p = 0,05

Os dados de massa corporal e dos tecidos adiposos, composição da carcaça e conteúdo de gordura em músculo e fígado são apresentados na **figura 1**. Embora não haja diferença na massa corporal, a expressão da CETP promoveu redução de aproximadamente 30 % no peso relativo dos depósitos de tecido adiposo. A análise da composição da carcaça também mostra redução de 37 % na massa gorda e aumento de 4 % na massa magra e teor de água. Na **tabela 2** pode-se verificar que a redução da adiposidade não é compensada por deposição ectópica de gordura no fígado ou músculo.



Figura 1. Expressão da CETP reduz adiposidade. Peso corporal (A), peso relativo (% peso corporal) dos depósitos adiposos perigonadal, perirrenal e subcutâneo (n= 36-40) (B), composição da carcaça (n=10) (C). Camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Média \pm epm. Teste "t"de Student, * p ≤ 0,01 NTg vs CETP.

	NTg	CETP
Fígado	$6,0 \pm 0,3$	5,7 ± 0,3
Músculo	$5,7 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,2$

Tabela 2. Conteúdo de gordura no fígado e músculo (%).

Camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Média ± epm (n= 7 por grupo). Lipídeos extraídos pelo protocolo de FOLCH.

Verificamos que a redução na adiposidade dos animais CETP não decorreu de alteração na ingestão calórica ou excreção de gordura, medida feita após um balanço de gordura de três dias (**Fig. 2**).



Figura 2. Expressão da CETP não afeta ingestão ou excreção de gordura. Ingestão de ração (A) e excreção de gordura (B) em 3 dias de balanço de gordura. Camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Média ± epm (n= quatro médias de três a quatro animais por gaiola)

Em seguida, testamos se os animais que expressam a CETP apresentavam redução da adiposidade devido à alteração na síntese lipídica. Para isso, foi analisada a lipogênese *in vivo*, estimada por incorporação de ³H-H₂O em lipídios do fígado e dos tecidos adiposos visceral e subcutâneo. A lipogênese determinada a partir de incorporação de ³H₂O em lipídeos é considerada como índice do fluxo total de precursores convertidos a ácidos graxos, independente da fonte de carbono (Saggerson et al., 1988), portanto, ideal para quantificar a lipogênese *in vivo* e em diferentes tecidos. No entanto, como esta metodologia tem baixa eficiência, para estudos *in vitro* com adipócitos isolados avaliamos a incorporação de ¹⁴C-acetato. Ambos os experimentos mostraram que a CETP não altera a síntese lipídica nesses tecidos lipogênicos (**Fig. 3**).



Figura 3. Expressão da CETP não altera lipogênese. Lipogênese i*n vivo*: Incorporação de ${}^{3}H_{2}O$ em lipídeos totais pelo tecido adiposo subcutâneo, visceral (perigonadal e perirrenal) e fígado (A, B, C) de camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade (n= 5-6). Lipogênese em adipócitos isolados: Incorporação de ${}^{14}C$ -acetato em lípides (10⁶ celulas, 1 µCi ${}^{14}C$ -acetato, 10 nM acetato, 2 horas, 37°C). Dois experimentos independentes, triplicatas, *pools* de 2-4 animais. Média ± epm.

Também avaliamos a captação tecidual de glicose, uma vez que esta é uma etapa limitante na esterificação e armazenamento de triglicérides em tecido adiposo (Stryer, 1995). Na **figura 4**, verifica-se que a expressão da CETP não altera a captação de glicose (estimada pela captação de ³H-2-deoxiglicose) por nenhum dos tecidos testados: músculo, fígado e tecidos adiposos marrom, perigonadal, peri-renal e subcutâneo. Chama a atenção a grande captação de

glicose pelo tecido adiposo marrom, o que pode ser explicado pela proposta de que a glicose é muito importante como combustível na termogênese neste tecido (Cooney & Newsholme, 1982), embora Saggerson et al. (1988) tenham mostrado que em ratos mantidos em temperatura normal, a glicose não é o principal combustível na respiração do adipócito marrom.

As curvas de radioatividade de ³H-2-deoxiglicose no plasma (**Fig. 4B**) e de glicemia (**Fig. 4C**) mostram que também não há nenhuma diferença na remoção plasmática de 2-deoxiglicose e glicose entre os grupos. A captação de glicose foi analisada em dois tempos, 15 minutos e 120 minutos após a aplicação de ³H-2-deoxiglicose. Aos 15 minutos, ainda em pico de captação, e aos 120 minutos, quando a glicemia já havia retornado a valores basais, e a radioatividade de ³H-2-deoxiglicose estava em *steady state*. É interessante citar que, conforme foi verificado, o desaparecimento da radioatividade da ³H-2-deoxiglicose no plasma ocorre apenas cinco dias após a injeção intraperitoneal (dados não mostrados).

Testamos também a capacidade de armazenamento de lipídeos exógenos nos animais que expressam ou não a CETP (**Fig.5**). Entretanto, pode-se verificar que a expressão da CETP não altera a retenção de lipídeos administrados por via oral. Essa medida foi feita 24 horas após uma sobrecarga oral de trioleína (TO) marcada com trício (5 uCi ³H-TO, 180 mg/animal). Nenhuma diferença significativa foi verificada nos tecidos testados (músculo, fígado e tecidos adiposos perigonadal e subcutâneo).



Figura 4. Expressão da CETP não altera a captação tecidual de glicose. Captação de glicose (*in vivo*) 15 e 120 minutos após injeção intraperitoneal de glicose (2g/Kg peso corporal) e ³H-2-deoxiglicose (150 μCi/Kg peso corporal). Captação pelo fígado, músculo (gastrocnêmio) e tecidos adiposos perigonadal, perirenal, subcutâneo e marrom (BAT) (A) e concentração de glicose no plasma (B, C). Camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Estado alimentado. Média ± epm (n=5-6 por grupo).

Considerando, então, que os camundongos CETP transgênicos apresentam semelhantes velocidades de síntese e retenção lipídica se comparados aos controles não transgênicos, levantamos a possibilidade de alteração na lipólise para explicar a redução da adiposidade neste grupo.

Para a determinação da lipólise, analisou-se a liberação de glicerol. Embora no processo de lipólise ocorra liberação de ácido graxo e glicerol, a determinação de glicerol representa melhor o grau da lipólise, uma vez que existe a recaptação de ácido graxo pelos adipócitos (Vaughan, 1962). Contudo, já foi demosntrado que liberação dos produtos da lipólise (ácido graxo e glicerol) é modulada pela ação da glicerolquinase e que a atividade dessa enzima é estimulada pelo sistema nervoso simpático (Rossi-Valentim et al., 2011).



Figura 5. A expressão da CETP não altera a retenção tecidual de lipídeos. Retenção de lipídeos (*in vivo*) pelo músculo, fígado e tecidos adiposos perigonadal e subcutâneo 24 horas após uma dose oral de ³H-trioleína e óleo de milho (5 uCi ³H-TO, 180 mg/animal). Camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Média ± epm (n= 7 por grupo).

De fato, experimentos *in vivo* mostram que animais que expressam CETP apresentam níveis plasmáticos de glicerol mais elevados que os controles, sugerindo aumento da lipólise basal no estado alimentado (**Fig. 6A**). Em contrapartida, nenhuma alteração significativa foi observada na lipólise desses animais após estímulo com isoproterenol, agonista beta-adrenérgico (**Fig. 6B**). Provavelmente o estímulo do isoproterenol foi tão potente que igualou a intensidade da lipólise dos dois grupos de animais nos dois estados – jejum e alimentado. A glicemia de jejum basal e após o estímulo com isoproterenol não foi diferente entre os grupos CETP e NTg (**Fig. 6C**).



Figura 6. A expressão da CETP aumenta a lipólise *in vivo* no estado alimentado. Níveis de glicerol plasmático (A, B) e glicemia (C) antes (basal) e 15 minutos após injeção intraperitoneal de isoproterenol (0,3 mg/Kg peso corporal) (estimulada). Camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Média \pm epm. (n=6-7 por grupo). Teste "t" de Student, * p ≤ 0,05

A lipólise também foi avaliada em adipócitos isolados de animais no estado alimentado (**Fig. 7**). Constatou-se aumento de aproximadamente 50% na lipólise estimulada por isoproterenol no grupo CETP (adiposo visceral e subcutâneo), sem diferença significativa na lipólise basal.



Figura 7. A expressão da CETP aumenta a lipólise estimulada em adipócitos isolados. Lipólise basal e estimulada por isoproterenol em adipócitos isolados de tecido adiposo visceral e subcutâneo. Camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade (10^6 células, 0,2 U/ml adenosina deaminase, com ou sem isoproterenol (10^{-5} M), 1h30m, 37°C) (triplicatas, 2-3 animais por *pool*, quatro experimentos independentes). Média ± epm. Teste "t"de Student, * p ≤ 0,05; # p= 0,06.

A disparidade entre as alterações encontradas *in vivo* e em adipócitos isolados pode ser decorrente de mecanismos contra-regulatórios presentes apenas nos animais inteiros e não nos adipócitos isolados. As catecolaminas, os peptídeos natriuréticos e a insulina são considerados os principais reguladores da lipólise (Kolditz e Langin, 2010). Os níveis circulantes de glucagon, GH e corticosteróide podem ser responsáveis pela diferença de respostas *in vivo* e *in vitro*.

Adicionalmente, foi medida a taxa metabólica basal por respirometria (**Fig. 8**). Identificou-se que, no estado alimentado, a expressão da CETP promove aumento de consumo de oxigênio e gasto energético total de aproximadamente 10 %, o que está de acordo com o fenótipo de adiposidade reduzida. Os valores de quociente respiratório (**Tabela 3**) indicam diferença apenas entre os estados de jejum e alimentado, coerente com o desvio do tipo de substrato (de carboidrato para lipídeos) que ocorre na transição entre estes estados.



Figura 8. Expressão da CETP aumenta o gasto energético corporal. Consumo de oxigênio (VO₂), de dióxido de caborno (CO₂) e gasto energético total (GET) nos estados alimentado e jejum normalizados por Kg de peso corporal (PC). Camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Média \pm epm (n=9-11 por grupo). Teste "t" de Student, * p ≤ 0,05; # p= 0,07.

Tabela 3. A expressão da CE	P não altera o quociente	respiratório (CO ₂ /VO ₂).
-----------------------------	--------------------------	---

	NTg	CETP
Alimentado	$0,87 \pm 0,02$ ^a	$0,86 \pm 0,02$ ^b
Jejum	$0,81 \pm 0,02$ ^a	$0,80 \pm 0,02$ ^b

Camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Média \pm epm (n= 9-11 por grupo). Teste "t"de Student. Letras iguais indicam diferença estatística significante p< 0,05. Os dados de consumo de oxigênio e gasto energético foram normalizados pelo peso corporal dos animais. A normalização desses dados é crítica para sua análise e, embora massas magra e gorda não contribuam da mesma forma para o consumo de oxigênio (Butler e Kozak, 2009), ambas são importantes na sua determinação (Kaiyala et al., 2010). Neste trabalho optou-se pela normalização por peso corporal, uma vez que se pretendia determinar o consumo de oxigênio do animal como um todo e não apenas de sua massa magra. Considerou-se que mesmo que a massa magra seja metabolicamente mais ativa que a massa gorda, os resultados dos ensaios funcionais do tecido adiposo sugerem que a diferença entre os grupos pode decorrer do metabolismo alterado nos depósitos adiposos, que constituem a massa gorda do grupo CETP.

Foi analisado também o conteúdo de colesterol e triglicérides nos tecidos adiposos dos animais em estudo. Verificou-se que a expressão da CETP alterou a proporção entre COL e TG no tecido adiposo subcutâneo em aproximadamente 70 % (**Fig. 9**).



Figura 9. A expressão da CETP aumenta a razão colesterol/triglicérides no tecido adiposo subcutâneo. Razão colesterol/triglicérides dos tecidos adiposos perigonadal e subcutâneo de camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Média \pm epm (n=10 por grupo). Teste "t"de Student, * p ≤ 0,05.

Quanto à expressão gênica, foram analisados genes de fatores e cofatores de transcrição do metabolismo lipídico, genes responsáveis pelo transporte de glicose e ácidos graxos, além de genes envolvidos na lipólise, gasto energético e termogênese (**Figuras 10, 11 e 12**). Constatou-se que, no tecido adiposo visceral, a CETP promoveu aumento da expressão de FATP1, ATGL e HSL. A expressão dos genes analisados no adiposo subcutâneo, contudo, não se mostrou afetada pela expressão da CETP. No tecido adiposo marrom, por sua vez, encontrou-se aumento de FATP1, ATGL e UCP1.

Outros genes importantes para o metabolismo dos adipócitos foram avaliados, mas não apresentaram diferença estatística significante, a saber, GLUT1, GLUT4, CD36, CPT1 e UCP2 no adiposo visceral e PPARa, PPARg, PGC1a, HSL, Perilipina, AMPK, CD36, CPT1, RIP140 no marrom.



Figura 10. Expressão da CETP modula positivamente genes envolvidos na lipólise e no transporte de ácidos graxos em tecido adiposo visceral. Expressão gênica por Real time PCR (RNAm) de camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Controle interno β -actina. Média ± epm (n=9-12 por grupo). Teste "t" de Student, * p ≤ 0,05.



Figura 11. Expressão de genes em tecido adiposo subcutâneo de camundongos que expressam a CETP e controles. Expressão gênica por Real time PCR (RNAm) de camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta *chow*, com 5 meses de idade. Controle interno β -actina. Média \pm epm (n=9-12 por grupo). Teste "t" de Student, * p ≤ 0,05.



A: Fatores e co-fatores de transcriçao

B: Transportatores de ácido graxo





UCP1 *

Figura 12. Expressão da CETP modula positivamente genes envolvidos na lipólise, no transporte de ácidos graxos e na termogênese em tecido adiposo marrom. Expressão gênica por Real time PCR (RNAm) de camundongos fêmeas CETP e NTg em dieta chow, com 5 meses de idade. Controle interno β-actina. Média ± epm (n=9-12 por grupo). Teste "t" de Student, * p ≤ 0,05.

A expressão proteica do receptor beta 3-adrenérgico foi avaliada nos tecidos adiposos visceral, subcutâneo e marrom (**Fig. 13**). Verificou-se aumento na expressão do receptor tanto no adiposo visceral, quanto no marrom. É importante ressaltar que a expressão proteica do receptor foi avaliada no extrato de membrana celular, pois apenas quando localizado na membrana o receptor exerce sua função. Para o resultado, foi feita somatória das bandas de 44 e 68 kDa, equivalente às formas do receptor glicosilada ou não. Notou-se que no tecido adiposo marrom a forma glicosilada não foi detectada. Antony et al. (1998) também encontraram discrepância nos tamanhos da proteína glicosilada, argumentando que pode haver diferença no processo de glicosilação entre os vários tipos celulares. De qualquer forma, a quantificação apenas das bandas de 44 kDa fornece o mesmo resultado, indicando aumento da expressão do receptor nos tecidos adiposos visceral e marrom, além de nenhuma diferença no adiposo subcutâneo.





Discussão

O processo de formação do tecido adiposo é complexo, dependente de fatores ambientais e genéticos relacionados ao metabolismo lipídico que podem atuar isoladamente ou em conjunto. Nesse sentido, foram avaliados os principais mecanismos funcionais e alguns aspectos moleculares capazes de contribuir para explicar a menor adiposidade dos camundongos que expressam a CETP. Inicialmente, foi verificado que a expressão da CETP não alterou a ingestão alimentar ou a absorção de gordura. Verificamos também que a redução da massa adiposa nos animais CETP não teve repercussão sobre o teor de lipídeos em tecidos não especializados no seu estoque, como fígado e músculo.

Em seguida, investigamos os principais mecanismos intrínsecos do tecido adiposo responsáveis pelo armazenamento lipídico. A síntese endógena (lipogênese *de novo*), a retenção de lipídeos exógenos provenientes da dieta, assim como a captação de glicose não foram alteradas pela expressão da CETP. Por outro lado, verificamos que o fenótipo de adiposidade reduzida nos animais CETP pode ser explicado pelo aumento da lipólise e do metabolismo basal desses animais

Podemos aventar alguns mecanismos para explicar como a CETP interfere na adiposidade. É importante enfatizar que esses mecanismos não são excludentes, podendo ocorrer simultaneamente.

Primeiramente, a CETP pode reduzir a captação de ácido graxo de duas maneiras: devido à redução da disponibilização de TG para o tecido adiposo e por diminuição da atividade da lipoproteína lípase (LPL). A redução da
disponibilização de TG ocorre pela ação da CETP no transporte reverso de colesterol, no qual a CETP retira TG das lipoproteínas que contêm apoB (VLDL, IDL e LDL) em troca de colesteril éster. As lipoproteínas que contêm apoB são responsáveis por transportar TG no plasma e, ao sofrerem ação da LPL, disponibilizam ácidos graxos dos TG para os tecidos. Como a CETP deixa essas lipoproteínas empobrecidas em TG, ocorre redução da disponibilidade de TG para os tecidos extra-hepáticos. Além disso, trabalho recente do nosso grupo de pesquisa mostrou que a atividade da LPL está reduzida nos animais que expressam a CETP (Salerno et al., 2009). Assim, haveria menor fornecimento de ácidos graxos para o tecido adiposo dos animais que expressam CETP, sendo esta uma das razões que contribuem para os menores depósitos de gordura nesses animais.

O segundo possível mecanismo de ação da CETP relaciona-se à modulação, por via indireta (aumento do teor de colesterol celular), da expressão de genes relacionados com a lipólise, transporte de ácidos graxos e termogênese. Verificamos que, no depósito visceral, a CETP aumentou a expressão de ATGL e HSL. O que é coerente com os achados de maior lipólise basal (*in vivo*) e estimulada por isoproterenol (em adipócitos isolados). Enquanto a ATGL medeia a hidrólise de TG principalmente durante a lipólise basal, a HSL é a principal lipase na lipólise estimulada por catecolaminas (Langin, 2006). Esta ação da CETP pode ser consequência da capacidade da CETP de modificar a concentração de colesterol nas membranas dos adipócitos. A modificação da concentração de COL nas membranas, por sua vez, pode decorrer tanto da ação da CETP, facilitando a captação tecidual de colesterol de HDL, ou ainda da ação intracelular da CETP.

Nesta segunda, a CETP poderia alterar o transporte de TG e CE entre retículo endoplasmático e gotícula lipídica, promovendo uma distribuição diferente de lipídeos no interior dos adipócitos (Izem e Morton, 2007).

Conforme já demonstrado, o conteúdo de colesterol nos adipócitos altera a expressão de diferentes genes relacionados ao metabolismo energético (Le Lay et al., 2001). Nosso grupo demonstrou que a expressão da CETP aumenta a captação de colesterol de HDL pelo tecido adiposo em modelos animais (Harada et al., 2007), enguanto outros mostraram que a CETP aumenta os níveis de colesterol de células adiposas em cultura (Benoist et al, 1997; Vassiliou e McPherson, 2004; Ju et al., 2011). Os resultados aqui descritos evidenciam que, de fato, a expressão da CETP altera o conteúdo de colesterol no tecido adiposo, evidenciado pelo aumento da relação entre COL e TG. Sabe-se, pela elegante série de trabalhos de Goldstein e Brown (2009), que o aumento do teor de colesterol das membranas celulares (especialmente do retículo endoplasmático) reprime uma família de fatores de transcrição denominada SREBP (sterol responsive element binding protein), os quais são potentes modulares das vias de síntese de colesterol e de ácidos graxos. Desta maneira, a expressão da CETP estaria indiretamente alterando a lipólise.

De forma semelhante, a CETP poderia alterar também a função de proteínas relacionadas com a lipólise. Evidências recentes mostram que o colesterol de membrana, especialmente nos microdomínios chamados *lipid rafts*, é responsável por estabilizar os receptores β -adrenérgicos (Cherezov et al., 2007). Assim, o aumento da concentração de colesterol na membrana dos adipócitos mediado

pela CETP poderia alterar a sinalização para lipólise iniciada pelos receptores βadrenérgicos.

O clássico modelo mosaico fluido sugerido como estrutura básica da membrana plasmática (Singer e Nicolson, 1972) foi remodelado para um sistema mais complexo, no qual não apenas proteínas como também microdomínios lipídicos (*lipid rafts*) flutuam lateralmente (London e Brown, 2000). Vários estudos se propuseram a investigar os efeitos do colesterol na estrutura e função de proteínas integrais de membrana como, por exemplo, os receptores acoplados à proteína G (Paila e Chattopadhyay, 2009). O colesterol, assim como outros lipídeos sintéticos, foi capaz de melhorar a estabilidade de receptores beta 2 adrenérgicos (Yao e Kobilka, 2005), além de ter se mostrado como componente necessário para cristalização do receptor, facilitando sua interação e oligomerização (Cherezov et al., 2007).

É possível que este aumento na estabilidade dos receptores β -adrenérgicos seja responsável pelo aumento do conteúdo protéico dos receptores β 3-adrenérgicos (B3AR) na membrana celular dos tecidos adiposos visceral e marrom dos animais CETP. Este é um aspecto muito relevante, pois o β 3 é o mais significante receptor β adrenérgico em adipócitos marrons maduros em roedores (Cannon e Nedergaard, 2004). No tecido adiposo branco, a ativação dos B3AR induz o processo da lipólise pela fosforilação da HSL e da perilipina, via PKA (Holm, 2003). No tecido adiposo marrom, os B3AR promovem, além da lipólise, a termogênese (Zhao et al., 1994). Quando estimulado, o tecido adiposo marrom promove aumento da expressão de RNAm para UCP1 (Ricquier et al., 1984). Em adipócitos isolados, foi demonstrado que a remoção da UCP1 bloqueia a indução

da termogênese pela norepinefrina (NE) (Matthias et al., 2000). Paralelamente, camundongos sem noradrenalina e adrenalina são incapazes de responder ao frio (Thomas et al., 1997). Além disso, foi demonstrado que a falta da UCP1 agrava o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta, e que mesmo em dieta normal, camundongos sem UCP1 desenvolvem obesidade (Feldmann et al., 2009). A termogênese dependente da UCP1 do tecido adiposo marrom tem se mostrado um eficiente sistema de oxidação do excesso de gordura, reduzindo a obesidade (Lowell e Spiegelman, 2000; Kajimura et al., 2008; Kozak et al., 2010).

Assim, sugerimos um modelo (**Fig. 14**) em que a CETP modularia etapas importantes da lipólise: a CETP aumenta a captação de colesterol de HDL pelos adipócitos, estabiliza os receptores β-adrenérgicos e intensifica a sinalização lipolítica. No adiposo visceral, a CETP também induz maior expressão de ATGL e HSL, aumentando adicionalmente a lipólise. No tecido adiposo marrom, a maior atividade dos B3AR é coerente com o aumento da expressão da UCP1, indicativo de aumento na termogênese. O aumento da termogênese é coerente com o incremento do gasto energético corporal dos camundongos que expressam a CETP.



Figura 14. Resumo da ação da CETP sobre a função dos adipócitos. Em vermelho, destacamse os genes e/ou proteínas moduladas pela expressão da CETP.

O aumento da lipólise (basal e/ou estimulada) do tecido adiposo branco libera mais ácidos graxos para a circulação, inclusive para o tecido adiposo marrom, que ativa UCP1 e aumenta termogênese. Wu et al. (2006) demonstraram que o estímulo por NE aumenta a expressão de FATP1 sem alterar a expressão de CD36, e que a perda de FATP1 impede a captação de ácidos graxos pelo tecido adiposo marrom, inibindo a *nonshivering* termogênese induzida por NE.

Pode-se imaginar, então, que a maior produção de calor pela UCP1 do adipócito marrom nos camundongos que expressam a CETP esteja ocorrendo à custa da maior liberação de ácidos graxos pelos adipócitos viscerais. Nesse sentido, a maior expressão da FATP1 no tecido adiposo marrom teria papel fundamental, internalizando estes ácidos graxos. Nota-se que a FATP1 está também aumentada também no adiposo visceral, o que a princípio pode parecer

contraditório com o aumento da lipólise. Entretanto, devemos lembrar que há um "ciclo fútil" em que parte dos ácidos graxos liberados na lipólise retorna aos adipócitos para ser re-esterificada em TG (Brooks et al., 1982). O aumento na captação de ácidos graxo é, na verdade, coerente com o aumento da lipólise sem causar alteração nos níveis de ácidos graxos.

Recentemente, Ju et al. (2011) publicaram que a expressão da CETP humana em células 3T3-L1 levou ao aumento da sinalização da insulina via AKT e promoveu maior captação de glicose pelos adipócitos. Nossos resultados, no entanto, mostram que a expressão da CETP não altera a captação de glicose pelo fígado, músculo ou tecidos adiposos e tampouco modula a expressão de RNAm dos transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT4). Tal discrepância pode ser explicada pelo modelo experimental estudado, sendo o modelo animal mais fisiológico.

Além dos dados com camundongos, nosso grupo confirmou que a redução da adiposidade seria de fato ação da CETP e não apenas uma consequência da inserção aleatória do gene da CETP. A inibição da CETP por anticorpo monoclonal em hamsters provocou maior ganho de peso corporal e adipócitos de maiores diâmetros (Tese doutorado: Patrícia R. Patrício, 2010).

Dados da literatura reforçam a relação da CETP com redução da adiposidade. Terán-García et al. (2008) reportaram que o polimorfismo I405V do gene da CETP contribui para alterações na adiposidade após superalimentação de indivíduos de peso normal, de forma que os indivíduos com menor atividade da CETP apresentavam maior incremento na massa adiposa visceral (130%).

O mesmo polimorfismo também foi avaliado em 295 indivíduos eutróficos por Oliveira e de Faria (2011). Estes autores encontraram que os indivíduos com menor atividade da CETP apresentavam índices mais elevados de massa corpórea (IMC) e de circunferência da cintura. Os autores também identificaram, independente do polimorfismo, uma correlação negativa entre atividade plasmática da CETP com o IMC e a circunferência da cintura. Contudo, Akbarzadeh et al. (2012) avaliaram outro polimosfismo da CETP (-629C/A) e encontraram níveis mais altos de CETP nos portadores de síndrome metabólica do que no grupo de indivíduos saudáveis.

Johansson et al. (2012) verificaram ainda que indivíduos obesos, após perda de peso, em período de manutenção de peso corporal, apresentaram aumento da expressão de CETP. Os autores especulam sobre um possível papel benéfico da CETP durante a perda de peso e sua manutenção.

Quanto a estudos em modelos animais, Zhou et al. (2006) usaram camundongos transgênicos para CETP sob controle de promotor específico de tecido adiposo (aP2). Os camundongos transgênicos possuíam concentrações plasmáticas fisiológicas da CETP e, quando comparados aos controles não transgênicos, apresentaram adipócitos menores e expressão de RNAm reduzida para os genes adipogênicos LPL, PPARγ e SREBP-1c.

Assim, o conjunto de dados apresentados permite concluir que a expressão da CETP altera a expressão e/ou função de proteínas relacionadas à lipólise e termogênese, aumentando o gasto energético e resultando em redução da gordura corporal. Tais achados indicam uma nova função antiadipogênica para a CETP.

REFERÊNCIAS

- Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, Chirala SS, Wakil SJ. 1995. Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. Proc Natl Acad Sci USA. 92: 4011–4015.
- Agellon LB, Walsh A, Hayek T, Moulin P, Jiang XC, Shelanski SA, Breslow JL, Tall AR. 1991. Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. J Biol Chem. 15;266(17):10796-801.
- Ahmadian M, Duncan RE, Varady KA, Frasson D, Hellerstein MK, Birkenfeld AL, Samuel VT, Shulman GI, Wang Y, Kang C, Sul HS. 2009. Adipose overexpression of desnutrin promotes fatty acid use and attenuates dietinduced obesity. Diabetes. 58(4): 855–866.
- Ahmadian M, Abbott MJ, Tang T, Hudak CS, Kim Y, Bruss M, Hellerstein MK, Lee HY, Samuel VT, Shulman GI, Wang Y, Duncan RE, Kang C, Sul HS. 2011. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. Cell Metab. 8;13(6):739-48.
- Akbarzadeh M, Hassanzadeh T, Saidijam M, Esmaeili R, Borzouei Sh, Hajilooi M, Mahjub H, Paoli M. 2012. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) -629C/A polymorphism and it's effects on the serum lipid levels in metabolic syndrome patients. Mol Biol Rep. 39(10):9529-34.
- Almind K, Manieri M, Sivitz WI, Cinti S, Kahn CR. 2007. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:2366–2371.
- Anthony NM, Gaidhu MP, Ceddia RB, 2009. Regulation of visceral and subcutaneous adipocyte lipolysis by acute AICAR-induced AMPK activation. Obesity (Silver Spring) 17, 1312–1317.
- Anthony A, Schepelmann S, Guillaume JL, Strosberg AD, Dhillon AP, Pounder RE, Wakefield AJ.1998. Localization of the beta(beta)3-adrenoceptor in the human gastrointestinal tract: an immunohistochemical study. Aliment Pharmacol Ther. 12(6):519-25.
- Arai Y, Hirose N, Yamamura K, Nakazawa S, Shimizu K, Takayama M, Ebihara Y, Homma S, Gondo Y, Masui Y, Inagaki H. 2003. Deficiency of choresteryl ester transfer protein and gene polymorphisms of lipoprotein lipase and hepatic lipase are not associated with longevity. J Mol Med. 81(2):102-9.
- Arias-Vásquez A, Isaacs A, Aulchenko YS, Hofman A, Oostra BA, Breteler M, van Duijn CM. 2007. The cholesteryl ester transfer protein (CETP)gene and the risk of Alzheimer's disease. Neurogenetics. 8(3):189-93.
- Assmann G. 2001. Pro and con: high-density lipoprotein, triglycerides, and other lipid subfractions are the future of lipid management. Am J Cardiol. 87: 2B-7B.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDOS SOBRE OBESIDADE. Gráficos Dados epidemiológicos/ Obesidade no Brasil. Disponível em: http://www.abeso.org.br/pdf/dados epidemiologicos.pdf>. Acesso em: 3 jul. 2004.
- Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the

thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. J. Biol. Chem. 276, 1486–1493.

- Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ And Tall AR. 2003. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 23:160-167.
- Barzilai N, Atzmon G, Derby CA, Bauman JM, Lipton RB. 2006. A genotype of exceptional longevity is associated with preservation of cognitive function. Neurology. 67(12):2170-5.
- Bauwens, J.D., Schmuck, E.G., Lindholm, C.R., Ertel, R.L., Mulligan, J.D., Hovis, I., Viollet, B., Saupe, K.W., 2011. Cold tolerance, cold-induced hyperphagia, and nonshivering thermogenesis are normal in a1-AMPK^{-/-} mice. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 301, R473–R483.
- Begriche K, logoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. 2006. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. Mitochondrion. 6(1):1-28.
- Benoist F, Lau P, McDonnell M, Doelle H, Milne R, McPherson R. 1997. Cholesteryl ester transfer protein mediates selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by human adipose tissue. J Biol Chem. 272(38):23572-7.

Berne RM, Levy MN .1998. Physiology. CV Mosby Co., St. Louis.

- Berti JA, De Faria EC, Oliveira HC. 2005. Atherosclerosis in aged mice overexpressing the reverse cholesterol transport genes. Braz J Med Biol Res. 38(3):391-398.
- Bochem AE, Kuivenhoven JA, Stroes ES. 2013. The promise of Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) inhibition in the treatment of cardiovascular disease. Curr Pharm Des. Jan 9. [Epub ahead of print].
- Botion LM, Kettelhut IC, Migliorini RH. 1995. Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet, Horm. Met. Res. (27) 310.
- Butler AA, Kozak LP. 2010. A recurring problem with the analysis of energy expenditure in genetic models expressing lean and obese phenotypes. Diabetes. 59(2):323-9.
- Brasaemale DL. 2007. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. J Lipid Res 48: 2547–2559.
- Brooks B, Arch JR, Newsholme EA. 1982. Effects of hormones on the rate of the triacylglycerol/fatty acid substrate cycle in adipocytes and epididymal fat pads. FEBS Lett. 146, 327–330.
- Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW, Mancuso JP, Rader DJ. 2004. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. N Engl J Med. 350(15):1505-1515.
- Brown MS, Goldstein JL. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science. 232:34-47.
- Bruce C, Chouinard RA Jr, Tall AR. 1998. Plasma lipid transfer proteins, highdensity lipoproteins, and reverse cholesterol transport. Annu Rev Nutr. 18:297-330.
- Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, Hellerstein MK. 2010. Calorie

restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. Am J Physiol Endocrinol Metab. 298(1):E108-16.

- Canbay A, Bechmann L, Gerken G. 2007. Lipid metabolism in the liver. Z Gastroenterology. 45:35-41.
- Capri M, Salvioli S, Sevini F, Valensin S, Celani L, Monti D, Pawelec G, De Benedictis G, Gonos ES, Franceschi C. 2006. The genetics of human longevity. Ann N Y Acad Sci. 1067:252-63.
- Cannon B, Nedergaard J. 2004. Brown adipose tissue: function and physio- logical significance. Physiol Rev 84: 277–359.
- Cannon B, Nedergaard J. 2010. Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans). Int J Obes (Lond). 34 Suppl 1:S7-16.
- Casquero AC, Berti JA, Salerno AG, Bighetti EJB, Cazita PM, Ketelhuth DFJ, Gidlund M, Oliveira HCF. 2006. Atherosclerosis is enhanced by testosterone deficiency and attenuated by CETP expression in transgenic mice. J. Lipid Res. 47: 1526–1534.
- Cazita PM, Berti JA, Aoki C, Gidlund M, Harada LM, Nunes VS, Quintão EC, Oliveira HC. 2003. Cholesteryl ester transfer protein expression attenuates atherosclerosis in ovariectomized mice. J. Lipid Res. 44: 33–40.
- Cazita PM, Barbeiro DF, Moretti AI, Quintão EC, Soriano FG. 2008. Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: a novel role for CETP. Shock. 30(5):590-5.
- Ceddia RB. 2013. The role of AMP-activated protein kinase in regulating white adipose tissue metabolism. Mol Cell Endocrinol. 25;366(2):194-203
- Cellini E, Nacmias B, Olivieri F, Ortenzi L, Tedde A, Bagnoli S, Petruzzi C, Franceschi C, Sorbi S. 2005. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) I405V polymorphism and longevity in Italian centenarians. Mech Ageing Dev. 126(6-7):826-8.
- Chabowski A, Górski J, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. 2007. Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane. 77(5-6):345-53.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human β2-adrenergic G protein-coupled receptor. Science. 318, 1258–1265.
- Cinti S. 2009. Transdifferentiation properties of adipocytes in the Adipose Organ. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 297, E977–E986.
- Clark RW, Sutfin TA, Ruggeri RB, Willauer AT, Sugarman ED, Magnusaryitey G, Cosgrove PG, Sand TM, Wester RT, Williams JA, Perlman ME, Bamberger MJ. 2004. Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24(3):490-497.
- Clark RW. 2006. Raising high-density lipoprotein with cholesteryl ester transfer protein inhibitors. Curr Opin Pharmacol. 6(2):162-8.

Commins SP, Watson PM, Frampton IC, Gettys TW. 2001. Leptin selectively reduces white adipose tissue in mice via a UCP1- dependent mechanism in brown adipose tissue. Am J Physiol. 280: E372–E373.

Cooney GJ, Newsholme, EA. 1982. FEBS Lett. 148,198-200

- Cooney GJ, Caterson ID, Newsholme EA. 1985. The effect of insulin and noradrenaline on the uptake of 2-[1-14C]deoxyglucose *in vivo* by brown adipose tissue and other glucose-utilising tissues of the mouse. FEBS Lett. 2;188(2):257-61.
- Coutinho T, Goel K, Corrêa de Sá D, Kragelund C, Kanaya AM, Zeller M, Park JS, Kober L, Torp-Pedersen C, Cottin Y, Lorgis L, Lee SH, Kim YJ, Thomas R, Roger VL, Somers VK, Lopez-Jimenez F. 2011. Central obesity and survival in subjects with coronary artery disease: a systematic review of the literature and collaborative analysis with individual subject data. J Am Coll Cardiol. 10;57(19):1877-86.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N. Engl. J. Med. 360, 1509–1517
- Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S, Hajduch E, Ferre P, Foufelle F. 2005. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. J. Biol. Chem. 280, 25250–25257.
- Dole VP, Meinertz H. 1960. Microdetermination of Long-chain Fatty Acids in Plasma and Tissues. J. Biol Chem. 235(9):2595-2599.
- Drayna DA, Jarnagin S, Mclean J, Henzel W, Kohr W, Fielding C And Lawn R. 1987. Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. Nature. 327:632-634.
- Duivenvoorden I, Teusink B, Rensen PC, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. 2005. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. Diabetes. 54: 664–671
- Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. Biochimie. 86(11):839-48.
- Enerbäck, S. 2010. Human brown adipose tissue. Cell Metab. 11, 248–252.
- Fredholm BB. 1981. Adenosine and lipolysis. Int J Obes. 5(6):643-9.
- Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. 2009. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogen- esis in mice exempt from thermal stress by living at thermo- neutrality. Cell Metab. 9: 203–209.
- Fidani L, Goulas A, Crook R, Petersen RC, Tangalos E, Kotsis A, Hardy J. 2004. An association study of the cholesteryl ester transfer protein Taql B polymorphism with late onset Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 357(2):152-4.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. 1997. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. Nat Genet. 15:269–272.
- Fog CK, Galli GG, Lund AH. 2012. PRDM proteins: important players in differentiation and disease. Bioessays. 34(1):50-60.
- Foger B, Chase M, Amar MJ, Vaisman BL, Shamburek RD, Paigen B, Fruchart-Najib J, Paiz JA, Koch CA, Hoyt RF, Brewer HB, Jr. And Santamarina-Fojo S.

1999. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. J Biol Chem. 274: 36912-36920.

- Folch J, Less M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol Chem. 226(1):497-509.
- Fritah A, Steel JH, Nichol D, Parker N, Williams S, Price A, Strauss L, Ryder TA, Mobberley MA, Poutanen M, Parker M, White R. 2010. Elevated expression of the metabolic regulator receptor-interacting protein 140 results in cardiac hypertrophy and impaired cardiac function. Cardiovasc Res 86: 443–451.
- Fritah A, Christian M, Parker MG. 2010. The metabolic coregulator RIP140: an update. Am J Physiol Endocrinol Metab. 299(3):E335-40.
- Fruchart JC, Duriez P, Staels B. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptoralpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 10: 245-257.
- Gaidhu MP, Anthony NM, Patel P, Hawke TJ, Ceddia RB, 2010. 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.
- Gao J, Katagiri H, Ishigaki Y, Yamada T, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kanzaki M, Yamamoto TT, Ishibashi S, Oka Y. 2007. Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation and insulin resistance. Diabetes. 56(1): 24-33.
- Ghosh RK, Ghosh SM. 2012. Current status of CETP inhibitors in the treatment of hyperlipidemia: an update. Curr Clin Pharmacol. 7(2):102-10.
- Gimeno RÉ, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA. 1997. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. Diabetes. 46:900–906.
- Goldberg AS, Hegele RA. 2012. Cholesteryl ester transfer protein inhibitors for dyslipidemia: focus on dalcetrapib. Drug Des Devel Ther. 6:251-9.
- Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. 2009. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 29(4):431-8.
- Gorin É, Tal-Or Z, Shafrir E. 1969. Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and triamcinolone treated rats, Eur. J. Biochem. (8) 370.
- Grion CM, Cardoso LT, Perazolo TF, Garcia AS, Barbosa DS, Morimoto HK, Matsuo T, Carrilho AJ. 2010. Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients. Eur J Clin Invest. 40(4):330-8.
- Ha YC, Barter PJ. 1982. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activityin sixteen vertebrate species. Comp Biochem Physiol B. 71(2):265-269
- Hamilton JA, Kamp F. 1999. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? Diabetes. 48: 2255– 2269.
- Hanson RW, Reshef L. 2003. Glyceroneogenesis revisited. Biochimie. 85(12):1199-205.
- Harada LM, Amigo L, Cazita PM, Salerno AG, Rigotti AA, Quintão ECR, Oliveira HCF. 2007. CETP expression enhances liver HDL-cholesteryl ester uptake but does not alter VLDL and biliary lipid secretion. Atherosclerosis. 191: 313–318.

- Hardie DG. 2003. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. Endocrinology. 144(12):5179-83.
- Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JI And Tall AR. 1995. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. J Clin Invest 96: 2071-2074.
- Hems DA, Rath EA, Verrinder T. 1975. Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of normal and genetically obese (ob/ob) mice during the 24-hour cycle. Biochem J. 150(2):167-73.
- Henry SL, Bensley JG, Wood-Bradley RJ, Cullen-McEwen LA, Bertram JF, Armitage JA. 2012. White adipocytes: more than just fat depots. Int J Biochem Cell Biol. 44(3):435-40.
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. 1988. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kDa liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. EMBO. J. 7:4119-4127.
- Herzog B, Hallberg M, Seth A, Woods A, White R, Parker MG. The nuclear receptor cofactor, receptor-interacting protein 140, is required for the regulation of hepatic lipid and glucose metabolism by liver X receptor. Mol Endocrinol (Baltimore, Md) 21: 2687–2697, 2007.
- Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, Arai T, Maruyama T, Yoshida Y, Ishigami M, Sakai N, Kameda-Takemura K, Matsuzawa Y. 1997. Geneticcholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan. Marked hyperalphalipoproteinemiacaused by CETP gene mutation is not associated with longevity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17(6):1053-9.
- Hofmann SM, Perez-Tilve D, Greer TM, Coburn BA, Grant E, Basford JE, Tschöp MH, Hui DY. 2008. Defective lipid delivery modulates glucose tolerance and metabolic response to diet in apolipoprotein E-deficient mice. Diabetes. 57(1):5-12.
- Holm C, 2003. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. Biochem Soc Trans. 1120-4.
- Honnor RC, Dhillon GS, Londos C. 1985. CAMP-dependent Protein Kinase and Lipolysis in Rat Adipocytes. J. Biol Chem. 260(28): 15122-15129.
- Huang Z, Inazu A, Nohara A, Higashikata T And Mabuchi H. 2002. Cholesteryl ester transfer protein inhibitor (JTT-705) and the development of atherosclerosis in rabbits with severe hypercholesterolaemia. Clin Sci (Lond). 103:587-594.
- Huang ZH, Reardon CA, Mazzone T. 2006. Endogenous ApoE expression modulates adipocyte triglyceride content and turnover. Diabetes. 55: 3394–3402.
- Hudson-Davies R, Pocock V, White R, Parker M, Milligan SR. 2009. Disturbances in core body temperature in RIP140-null mice. J Therm Biol 34: 100 –108.
- Huuskonen J, Ehnholm C. 2000. Phospholipid transfer protein in lipid metabolism. Curr Opin Lipidol 11: 285-289.
- Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. 2001. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. Diabetes Care. 24(4):683-9.

- Izem L, Morton RE. 2001. Cholesteryl ester transfer protein biosynthesis and cellular cholesterol homeostasis are tightly interconnected. J Biol Chem.13;276(28):26534-41.
- Izem L, Morton RE. 2007. Possible role for intracellular cholesteryl ester transfer protein in adipocyte lipid metabolism and storage. J Biol Chem. 282(30):21856-65.

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

- Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. 2004. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. J. Biol. Chem. 279: 48968–48975.
- Jiang XC, Masucci-Magoulas L, Mar J, Lin M, Walsh A, Breslow JL, Tall A. 1993. Down-regulation of mRNA for the low density lipoprotein receptor in transgenic mice containing the gene for human cholesteryl ester transfer protein. Mechanism to explain accumulation of lipoprotein B particles. J Biol Chem. 268(36):27406-12.
- Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. 1992. Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. J Clin Invest 90: 1290-1295.
- Johansson LE, Danielsson AP, Parikh H, Klintenberg M, Norström F, Groop L, Ridderstråle M. 2012. Differential gene expression in adipose tissue from obese human subjects during weight loss and weight maintenance. Am J Clin Nutr. 96(1):196-207.
- Ju X, Cui Q, Zhang M, Wang W, Jiang J, Chang Y, Wang K, Yang T, Zhou H. 2011. Human cholesteryl ester transfer protein enhances insulin-mediated glucose uptake in adipocytes. Life Sci. 26;89(13-14):479-84.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell Metabol. 1:15–25.
- Kaiyala KJ, Morton GJ, Leroux BG, Ogimoto K, Wisse B, Schwartz MW. 2010. Identification of body fat mass as a major determinant of metabolic rate in mice. Diabetes. 59(7):1657-66.
- Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM. 2010. Transcriptional control of brown fat development. Cell Metab. 7;11(4):257-62.
- Kako Y, Masse M, Huang LS, Tall AR, Goldberg IJ. 2002. Lipoprotein lipase deficiency and CETP in streptozotocin-treated apoB- expressing mice. J Lipid Res. 43:872-877.
- Kim S, Moustaid-Moussa N. 2000. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. J Nutr. 130:S3110–5.
- Klingenberg M. 1999. Uncoupling protein--a useful energy dissipator. J Bioenerg Biomembr. 31(5):419-30.
- Knouff C. Auwerx J. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. Endocr Rev. 25 (6): 899–918.
- Koh HJ, Hirshman MF, He H, Li Y, Manabe Y, Balschi JA, Goodyear LJ, 2007.

Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes. Biochem. J. 403, 473–481.

Koppen A, Kalkhoven E. Brown vs white adipocytes: 2010. The PPAR coregulator story. FEBS 584:3250–9.

Kolditz CI, Langin D. 2010. Adipose tissue lipolysis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 13(4):377-81.

Kopelman PG. 2000. Obesity as a medical problem. Nature. 6;404(6778):635-43.

- Koropatnick TA, Kimbell J, Chen R, Grove JS, Donlon TA, Masaki KH, Rodriguez BL, Willcox BJ, Yano K, Curb JD. 2008. A prospective study of high-density lipoprotein cholesterol, cholesteryl ester transfer protein gene variants, and healthy aging in very old Japanese- american men. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63(11):1235-40.
- Kozak LP, Koza RA, Anunciado-Koza R. 2010. Brown fat thermogenesis and body weight regulation in mice: relevance to humans. Int J Obes (Lond). 34 Suppl 1:S23-7.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med. 15;47(4):333-43
- Langin D. 2006. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. Pharmacol. Res. 53: 482–491.

Laskowski KR, Russell RR. 2008. Uncoupling Proteins in Heart Failure. Curr Heart Fail Rep. 5(2): 75–79

- Le Lay S, Krief S, Farnier C, Lefre re I, Le Liepvre X, Bazin R, Ferre P, Dugail I. 2001. Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. J. Biol Chem. 276 (20): 16904–16910.
- Lean ME, James WP. 1986. Brown adipose tissue in man. In: Trayhurn, editora DGNP. Brown Adipose Tissue. London, Baltimore, MD: E. Arnold. p. 339-365.
- Löfgren P, Hoffstedt J, Näslund E, Wirén M, Arner P. 2005. Prospective and controlled studies of the actions of insulin and catecholamine in fat cells of obese women following weight reduction. Diabetologia. 48(11):2334-42.
- Leonardsson G, Steel JH, Christian M, Pocock V, Milligan S, Bell J, So PW, Medina-Gomez G, Vidal-Puig A, White R, Parker MG. 2004. Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. Proc Natl Acad Sci USA 101: 8437–8442
- London E, Brown DA. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). 2000. Biochim Biophys Acta. 23;1508(1-2):182-95.
- Lowell BB, Spiegelman BM. 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature. 404: 652–660.
- Mandard S, Müller M, Kersten S. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. Cell Mol Life Sci. 61(4): 393–416.
- Matthias A, Ohlson KEB, Fredriksson JM, Jacobsson A, Ne- dergaard J, and Cannon B. 2000. Thermogenic responses in brown-fat cells are fully UCP1dependent: UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty-acid induced thermogenesis. J Biol Chem 275: 25073–25081.
- Mattu HS, Randeva HS. 2013. Role of adipokines in cardiovascular disease. J

Endocrinol. 2;216(1):T17-36.

- McGarry JD, Brown NF. 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. Eur J Biochem. 244: 1–14
- Michalik L, Wahli W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. Curr Opin Biotechnol. 10:564–570.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel -Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, 2011. Brasília–DF, 2012.
- Monteiro CA, Conde WL, Popkin BM. 2004. The burden of disease from undernutrition and overnutrition in countries undergoing rapid nutrition transition: a view from Brazil. Am J Public Health. 94(3):433-4.
- Montel-Hagen A, Blanc L, Boyer-Clavel M, Jacquet C, Vidal M, Sitbon M, Taylor N. 2008. The Glut1 and Glut4 glucose transporters are differentially expressed during perinatal and postnatal erythropoiesis. Blood. 1;112(12):4729-38.
- Mulligan JD, Gonzalez AA, Stewart AM, Carey HV, Saupe KW. 2007. Upregulation of AMPK during cold exposure occurs via distinct mechanisms in brown and white adipose tissue of the mouse. J. Physiol. 580, 677–684.

Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Princípios de bioquímica. 4 ed. Sarvier, 2006.

- Norris AW, Hirshman MF, Yao J, Jessen N, Musi N, Chen L, Sivitz WI, Goodyear LJ, Kahn CR. 2008. Endogenous peroxisome proliferator-activated receptorgamma augments fatty acid uptake in oxidative muscle. Endocrinology. 149(11):5374-83.
- Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. 2012. PPARγ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. Cell Metab. 7;15(3):395-404.
- Okamatsu-Ogura Y, Uozumi A, Toda C, Kimura K, Yamashita H, Saito M. 2007. Uncoupling protein 1 contributes to fat-reducing effect of leptin. Obes Res Clin Pract. 1: 233–241.
- Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, Minowa T, Maeda K, Shinkai H. 2000. Acholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosisin rabbits. Nature. 406(6792):203-7
- Okazaki, H., J. Osuga, Y. Tamura, N. Yahagi, S. Tomita, F. Shionoiri,Y. Iizuka, K. Ohashi, K. Harada, S. Kimura, et al. 2002. Lipolysis in the absence of hormone-sensitive lipase: evidence for a common mechanism regulating distinct lipases. Diabetes. 51: 3368–3375.
- Oliveira HC, de Faria EC. 2011. Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. IUBMB Life. 63(4):248-57.
- Oliveira HCF. 2005. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. Células Uma abordagem multidisciplinar. Editora Manole. São Paulo.
- Oliveira HCF, Quintão ECR. 1996. *In vitro* cholesteryl ester bidirectional flow between high density lipoproteins and triglyceride rich emulsions: effects of particle concentration, cholesteryl ester transfer protein and oleic acid. J. Biochem. Biophys. Methods. 32: 45-57.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). Global strategy on diet, physical activity and health. Obesity and overweight. 2003.

- Organização Mundial de Saúde (OMS). Sobrepeso e Obesidade. Disponível em: http://www.who.int/dietphisycalactivity/publications/facts/obesity/en. Acesso em: 25. Jun. 2004.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). Obesity and overweight Fact sheet N°311 May 2012. Disponível em: <<u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/</u>. > Acesso em: 25. fev. 2013.
- Osono Y, Woollett LA, Herz J, Dietschy JM. 1995. Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. J. Clin. Invest. 95(3): 1124-32.
- Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N. 2000. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. Proc Natl Acad Sci U S A. 18;97(2):787-92.
- Paila YD, Chattopadhyay A. 2009. The function of G-protein coupled receptors and membrane cholesterol: specific or general interaction? Glycoconj J. 26(6):711-20.
- Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, Saha AK. 2002. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn- glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP- activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. J. Biol. Chem. 277, 32571–32577.
- Patrício PR. 2010. A expressão da proteína de transferência de colesteril ester (CETP) modula a adiposidade e a expressão de genes envolvidos em lipólise e lipogênese. Tese apresentada ao instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na area de fisiologia.

Pearson H. 2006. When good cholesterol turns bad. Nature. 444: 794-795.

- Pedersen A, Baumstark MW, Marckmann P, Gylling H, Sandstrom B. 2000. An olive oil-rich diet results in higher concentrations of LDL cholesterol and a higher number of LDL subfraction particles than rapeseed oil and sunflower oil diets. J Lipid Res. 41: 1901-1911.
- Pinent M, Prokesch A, Hackl H, Voshol PJ, Klatzer A, Walenta E, Panzenboeck U, Kenner L, Trajanoski Z, Hoefler G, Bogner-Strauss JG. 2011. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are involved in fat loss in JunB-deficient mice. Endocrinology. 152(7):2678-89.
- Pohl J, Ring A, Ehehalt R, Herrmann T, Stremmel W. 2004. New concepts of cellular fatty acid uptake: role of fatty acid transport proteins and of caveolae. Proc Nutr Soc. 63(2):259-62.
- Pohl J, Ring A, Korkmaz U, Ehehalt R, Stremmel W. 2005. FAT/CD36 Mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membranerafts. Mol Biol Cell. 16: 24–31.
- Qiao L, Zou C, Shao P, Schaack J, Johnson PF, Shao J. 2008. Transcriptional regulation of fatty acid translocase/CD36 expression by CCAAT/enhancerbinding protein {alpha}. J. Biol Chem. 283 (14): 8788-95.
- Qiu X, Mistry A, Ammirati MJ, Chrunyk BA, Clark RW, Cong Y, Culp JS, Danley DE, Freeman TB, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawrylik SJ, Hayward CM, Hensley P, Hoth LR, Karam GA, Lira ME, Lloyd DB, McGrath

KM, Stutzman-Engwall KJ, Subashi AK, Subashi TA, Thompson JF, Wang IK, Zhao H, Seddon AP. 2007. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. Nat Struct Mol Biol. 14(2):106-13.

- Radeau T, Lau P, Robb M, McDonnell M, Ailhaud G, McPherson R. 1995. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA abundance in human adipose tissue: relationship to cell size and membranecholesterol content. J Lipid Res. 36(12):2552-61
- Radeau T, Robb M, Lau P, Borthwick J, McPherson R. 1998. Relationship of adipose tissue cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA to plasma concentrations of CETP in man. Atherosclerosis. 139(2):369-76.
- Reid BN, Ables GP, Otlivanchik OA, Schoiswohl G, Zechner R, Blaner WS, Goldberg IJ, Schwabe RF, Chua SC Jr, Huang LS. 2008. Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. J Biol Chem. 2008 May 9;283(19):13087-99.
- Ricquier D, Mory G, Bouillaud F, Thibault J, and Weissenbach J. 1984. Rapid increase of mitochondrial uncoupling protein and its mRNA in stimulated brown adipose tissue. Use of a cDNA probe. FEBS Lett. 178(2):240-4.

Rodbell M. 1964. Metabolism of isolated fat cells. J. Biol. Chem. 239, 375–380.

Rodríguez E, Mateo I, Infante J, Llorca J, Berciano J, Combarros O. 2006. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) polymorphism modifies the Alzheimer's disease risk associated with APOE epsilon4 allele. J Neurol. 253(2):181-5.

Rosen ED, Spiegelman BM. 2000. Molecular regulation of adipogenesis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16: 145–171.

Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. 2002. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: A unified pathway. Genes & Dev. 16: 22–26.

Rosen E, Macdonald O. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. Nat Rev Mol Cell Biol. 7:885–96.

- Rossi-Valentim R, Frasson D, Garófalo MAR, Navegantes LCC, Kettelhut ÍC. 2011. Glycerol kinase activity is modulated by noradrenaline and insulin in rat white adipose tissue. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011, Rio de Janeiro. Livro de Resumos da XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011.
- Saggerson ED, McAllister TW, Baht HS. 1988. Lipogenesis in rat brown adipocytes. Effects of insulin and noradrenaline, contributions from glucose and lactate as precursors and comparisons with white adipocytes. Biochem J. 1;251(3):701-9.
- Salerno AG, Silva TR, Amaral MEC, Alberici LC, Bonfleur ML, Patrício PR, Francesconi EPMS, Grassi-Kassisse DM, Vercesi AE, Boschero AC, Oliveira HCF. 2007. Overexpression of apolipoprotein CIII increases and CETP reverses diet-induced obesity in transgenic mice. Int J Obes (Lond). 31(10):1586-95.
- Salerno AG, Patrício PR, Berti JA, Oliveira HC. 2009. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) increases postprandial triglyceridaemia and delays

triacylglycerol plasma clearance in transgenic mice. Biochem J. 1;419(3):629-34.

- Sanders AE, Wang C, Katz M, Derby CA, Barzilai N, Ozelius L, Lipton RB. 2010. Association of a functional polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene with memory decline and incidence of dementia. JAMA. 303(2):150-8.
- Sawada T, Miyoshi H, Shimada K, Suzuki A, Okamatsu-Ogura Y, Perfield JW 2nd, Kondo T, Nagai S, Shimizu C, Yoshioka N, Greenberg AS, Kimura K, Koike T. 2010. Perilipin overexpression in white adipose tissue induces a brown fat-like phenotype. PLoS One. 16;5(11).
- Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J. 1997. Peroxisome proliferatoractivated receptors, orphans with ligands and functions. Curr Opin Lipidol. 8: 159-166.
- Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM. 2007. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. Cell Metab. 6(1):38-54.
- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. Nature. 21;454(7207):961-7
- Sellayah D, Bharaj P, Sikder D. 2011. Orexin is required for brown adipose tissue development, differentiation, and function. Cell Metab. 5;14(4):478-90.
- Singer SJ, Nicolson GL. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 18;175(4023):720-31.
- Smith S. 1994. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide seven enzymes. FASEB J. 8:1248–1259
- Sponarova J, Mustard KJ, Horakova O, Flachs P, Rossmeisl M, Brauner P, Bardova K, Thomason-Hughes M, Braunerova R, Janovska P, Hardie DG, Kopecky J. 2005. Involvement of AMP-activated protein kinase in fat depotspecific metabolic changes during starvation. FEBS Lett. 579, 6105–6110.
- Staels B, Schoonjans K, Fruchart JC Auwerx J. 1997. The effects of fibrates and thiazolidinediones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). Biochimie 79: 95- 99.
- Stryer L. 1995. Biochemistry. W. H. Freeman and Co., New York.
- Tall AR. 1993. Plasma cholesteryl ester transfer protein. J Lipid Res. 34(8):1255-1274.
- Tall AR. 1995. Plasma lipid transfer proteins. Annu. Rev. Biochem. 64:235–257.
- Tall AR, Yvan-Charvet L, Wang N. 2007. The failure of torcetrapib: was it the molecule or the mechanism? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27:257-260.
- Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. 2002. Role of peroxisome proliferatoractivated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. Diabetes. 51:2045–55
- Tanaka T, Yoshida N, Kisimoto T, Akira S. 1997. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. EMBO J.16:7432–43.
- Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, Reitman ML, Deng CX, Li C, Kimmel AR, Londos C. 2001. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and

resistance to diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci U S A. 22;98(11):6494-9.

- Ten S, Maclaren N. 2004. Insulin resistance syndrome in children. J Clin Endocrinol Metab. 89(6):2526-39.
- Terán-García M, Després JP, Tremblay A, Bouchard C. 2008. Effects of cholesterol ester transfer protein (CETP) gene on adi- posity in response to long-term overfeeding. Atherosclerosis 196, 455–460.
- Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D. 2003. Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. J. Biol. Chem. 278: 33370–33376.
- Thomas SA, Palmiter RD. 1997. Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. Nature. 387:94–97.
- Vassiliou G, McPherson R. 2004. A novel efflux-recapture process underlies the mechanism of high-density lipoprotein cholesteryl ester-selective uptake mediated by the low-density lipoprotein receptor-related protein. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24(9):1669-75.
- Vaughan M. 1962. The production and release of glycerol by adipose tissue incubated *in vitro*. J. Biol. Chem. 237, 3354–3358.
- Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. 2004. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. J. Biol. Chem. 279: 47066–47075.
- Vercesi AÉ, Borecký J, Maia Ide G, Arruda P, Cuccovia IM, Chaimovich H. 2006. Plant uncoupling mitochondrial proteins. Annu Rev Plant Biol.57:383-404
- Voshol PJ, Rensen PC, van Dijk KW, Romijn JA, Havekes LM. 2009. Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: studies using genetically engineered mouse models. Biochim Biophys Acta. 1791(6):479-85.
- Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. 2009. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. J Lipid Res. Suppl: S138-43.
- Wang J, Perrard XD, Perrard JL, Mukherjee A, Rosales C, Chen Y, Smith CW, Pownall HJ, Ballantyne CM, Wu H. 2012. ApoE and the role of very low density lipoproteins in adipose tissue inflammation. Atherosclerosis. 223(2):342-9.
- Watson KE, Horowitz BN, Matson G. 2003. Lipid abnormalities in insulin resistant states. Rev Cardiovasc Med. 4(4):228-36.
- Watt MJ, Holmes AG, Pinnamaneni SK, Garnham AP, Steinberg GR, Kemp BE, Febbraio MA. 2006. Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 290, E500– E508.
- Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. 2009. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. Lancet. 28;373(9669):1083-96.
- Wu Q, Kazantzis M, Doege H, Ortegon AM, Tsang B, Falcon A, Stahl A. 2006. Fatty acid transport protein 1 is required for nonshivering thermogenesis in brown adipose tissue. Diabetes. 55(12):3229-37
- Yao Z, Kobilka B. 2005. Using synthetic lipids to stabilize purified beta2 adrenoceptor in detergent micelles. Anal Biochem. 15;343(2):344-6.

- Yin, W., Mu, J., Birnbaum, M.J., 2003. Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. 278, 43074–43080.
- Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. 2009. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. J Lipid Res. 50(1):3-21.

Zhang C, McFarlane C, Lokireddy S, Masuda S, Ge X, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R. 2012. Inhibition of myostatin protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation and promoting a brown adipose phenotype in mice. Diabetologia. 55(1):183-93.

- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994;372(6505):425–432.
- Zhang Z, Yamashita S, Hirano K, Nakagawa-Toyama Y, Matsuyama A, Nishida M, Sakai N, Fukasawa M, Arai H, Miyagawa J, Matsuzawa Y. 2001. Expression of cholesteryl ester transfer protein in human atherosclerotic lesions and its implication in reverse cholesterol transport. Atherosclerosis. 159(1):67-75.
- Zhao J, Unelius L, Bengtsson T, Cannon B, and Nedergaard J. 1994. Coexisting Badrenoceptor subtypes: significance for thermogenic process in brown fat cells. Am J Physiol Cell Physiol 267: C969– C979.
- Zhou H, Li Z, Hojjati MR, Jang D, Beyer TP, Cao G, Tall AR, Jiang XC. 2006. Adipose tissue-specific CETP expression in mice: impact on plasma lipoprotein metabolism. J Lipid Res. 47(9):2011-9.
- Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, Lee JH, Khadem S, Ren S, Li S, Silverstein RL, Xie W. 2008. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. Gastroenterology. 2008 Feb;134(2):556-67. Epub 2007 Nov 28.
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Science. 306: 1383–1386.

ANEXOS

Apolipoprotein CIII overexpression exacerbates high fat diet-induced adiposity by modulating lipid storage, lipogenesis and lipolysis rates

Helena F. Raposo, Larissa S. Kato, Helena C. F. de Oliveira*

Dept Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Abbreviated title: Apo CIII modulates lipid storage, lipogenesis and lipolysis

* Corresponding author: Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas - Rua Monteiro Lobato, 255 - Campinas - SP - Brasil - CEP 13083-862. Tel +55-19-35216204,
Fax +55-19-35216185, email: <u>ho98@unicamp.br</u>

Abbreviations used in this paper:

Apo, apolipoprotein; CHOL, cholesterol; HF, High fat; IP, intraperitoneally; KRBA, krebsringer bicarbonate buffer; LPL, lipoprotein lipase; NTg, non-transgenic; PPARs, peroxisome-proliferator-activated receptors; TG, triglyceride; TLR, toll-like receptors; TO, triolein.

Abstract

In this work, we examined the major mechanisms involved in the increased adiposity response to a high fat (HF) diet previously observed in mice overexpressing the apolipoprotein (apo) CIII. We measured the adipose tissue's capacity to store exogenous lipids, de novo lipogenesis and lipolysis rates. In mice fed a HF diet from 2 to 4 months of age, there was a 3-fold increase in the exogenous lipid retention capacity of apo CIII mice adipose tissue compared to non-transgenic (NTg) mice. However, lipogenesis in apo CIII mice was reduced by 20-50%; therefore, the overall adipose tissue depot masses did not differ between the two groups of mice, although leptin levels were higher in apo CIII mice. When the HF diet was provided to older mice, from 4 to 6 months of age, both adipose masses and leptin levels were increased. While exogenous lipid retention capacity and lipogenesis were similar in both groups, the lipolysis rates measured in isolated adipocytes and in vivo were significantly reduced in apo CIII mice. Altogether, these data indicate that apo CIII overexpression promotes age-dependent effects on adipose tissue lipid metabolism, namely, stimulation of exogenous lipid storage at early ages and repression of lipolysis at late ages.

Supplementary key words: adipose tissue, hypertriglyceridemia, non-esterified fatty acids, high fat diet, lipid accumulation, transgenic mice.

Introduction

Obesity is defined as a disease in which excess body fat accumulates and may adversely affect one's health. It is considered to be a heterogeneous group of conditions derived from multiple causes affecting energy balance. Body fat content is determined by interactions between genetic, environmental and psychosocial factors acting through the mediators of energy intake and expenditure (1). Several studies have shown a relationship between obesity, hypertriglyceridemia, hypertension, glucose intolerance and/or insulin resistance, which characterize the metabolic syndrome (2-4). The World Health Organization estimates that approximately 2 billion people around the world are overweight, and approximately 300 million are obese, although prevalence rates vary dramatically from country to country (<u>http://www.who.int/topics/obesity/en/</u>). Overweight and obesity are associated with an excess of cardiovascular and noncardiovascular deaths in the general population (5, 6).

Hypertriglyceridemia is one of the most common types of dyslipidemia found in obesity, together with low HDL levels and the presence of small and dense LDL particles (7). Most disorders in lipoprotein metabolism in obese subjects are consequences of insulin resistance. However, it is not established whether primary hyperlipidemia can predispose one to obesity. Several pieces of evidence have suggested that proteins primarily related to lipoprotein plasma transport, such as apolipoprotein CIII and E, may significantly affect the process of body fat accumulation (8-14).

Apo CIII is mainly found in secreted triglyceride (TG)-rich lipoproteins (15) and regulates intravascular TG metabolism. In excess, apo CIII delays the clearance of very

low-density lipoprotein (VLDL) and chylomicrons (8, 16, 17). Studies have shown that TG plasma levels are directly correlated to the amount of apo CIII (18, 19). In addition, growing evidence has linked apo CIII concentrations in VLDL and LDL to coronary heart disease (20, 21). Transgenic mice overexpressing human apo CIII have marked elevated TG and non-esterified fatty acid (NEFA) levels (22). Apparently, apo CIII overexpression increases the half-life of TG-rich lipoproteins without changing lipoprotein lipase (LPL) activity (23, 24).

We previously hypothesized that apo CIII overexpression would compromise fatty acid delivery to adipose tissues and would thus contribute to resistance to diet-induced obesity, similarly to what was described for overexpression of apo CI (8). However, this was not the case, as after five months of a high fat diet, apo CIII overexpressing mice accumulated more body fat than non-transgenic littermates (12). However, the role of apo CIII on adiposity seems to be quite complex because apo CIII knockout mice exhibited more severe diet-induced obesity than wild type mice (9).

The aim of the present study was to evaluate major functional and biochemical processes, such as lipid retention capacity, lipogenesis and lipolysis rates, which could be involved in diet-induced fat accumulation in transgenic mice overexpressing apo CIII.

Materials and Methods

Animals and treatments

Human apo CIII transgenic mice (line 3707) (25) founders were originally donated by Dr. Alan R. Tall (Columbia University, New York, NY, 1996) and crossbred with wild-type (NTg) C57Bl6 mice. The apo CIII transgenic colony has been kept for 15 years at the animal facilities of the Division of Physiology and Biophysics at the State University of

Campinas (São Paulo, Brazil). The experiments were approved by the university's ethics committee (protocol # 1607-1). Transgenic mice were screened according to their triglyceride plasma levels (CIII > 300 mg/dL and controls < 100 mg/dL). All experiments were performed with female mice because it was shown in earlier studies that they are more responsive to diet-induced adiposity (12). Apo CIII transgenic and nontransgenic (NTg) female littermates had free access to standard laboratory rodent diet (CR1; Nuvital, Colombo, Paraná, Brazil) and water *ad libitum* and were housed in a room at $22^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ with a 12-hour light-dark cycle. Two studies using a high fat diet (HF) were performed. In the first study, mice groups were treated with a HF diet between the ages of 2 to 4 months, while the groups in the second study were fed a HF diet from 4 to 6 months of age. The HF diet was the AIN-93 diet modified as followed: 19% protein, 25% total fat (20% butter and 5% lard), 45% carbohydrates and 5% fiber, totaling 448 Kcal/100 g. Mice body weight and food consumption were determined 3 times a week. Body weights were taken individually, whereas food ingestion was measured as the average consumed by 4 mice per cage per day. Plasma levels of total cholesterol, triglycerides (Chod-Pap; Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) and non-esterified fatty acids (Wako Chemical, Neuss, Germany) were determined by enzymatic-colorimetric methods according to the manufacturers' instructions. Mice underwent an oral glucose tolerance test. After an overnight fast and administration of an oral dose of glucose solution (1.5 g/kg), plasma glucose levels were determined at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min. Glycemia was measured with a glucosimeter Accu-Chek Advantage (Roche Diagnostic, Switzerland).

In vivo CO₂ production rates

Whole body *in vivo* CO₂ production rates were measured in a temperature-monitored respirometer, as previously described (26). Fed mice were adapted to the respirometer

chamber twice a day for 5 minutes each. After the adaptation period, the CO_2 expiration of each mouse was monitored for 5 minutes once a day, between 9 AM and 11 AM, for 5 consecutive days. CO_2 production rates were calculated as an average of 5 measurements for each mouse.

Exogenous lipid retention

After 8 hours of fasting, animals received an oral dose of ³H-triolein (5 uCi ³H-TO, GE Healthcare-Amersham, United Kingdom) mixed with corn oil (180 mg/mouse). Twentyfour hours later, mice were deeply anesthetized and killed by exsanguination. Liver, gastrocnemius muscle and perigonadal and subcutaneous fat depots were excised and weighed. Tissue lipids were extracted using the Folch (1957) method, and beta radiation was counted with scintillation liquid (GE Healthcare-Amersham, United Kingdom) in a Beckman - LS 6000TA Beta counter. Feces were collected 3 days before and 24 h after the oral dose of ³H-triolein. Feces and food samples were dried, and their fat content was extracted by the Folch (27) method to determine the amount of fat intake and excretion.

In vivo lipogenesis

Lipid synthesis was measured *in vivo* by following the incorporation of ³H-H₂O into tissue lipids as previously described by Osono et al. (28). Briefly, fed mice were given 20 mCi ³H-H₂O i.p. (GE Healthcare-Amersham, United Kingdom). Animals were killed 60 min after receiving the tritiated water, and blood and tissue samples were collected. Lipids from the liver and adipose depots (perigonadal and subcutaneous) were extracted by the Folch (27) method. Total lipid extracts from tissues and plasma samples were used for scintillation counting. The lipogenic rates were calculated as nmol of ³H incorporated into lipids per hour per gram of wet tissue.

Adipocyte isolation

Mouse adipocytes were isolated using modifications of the established protocol for rat adipocytes (29). Briefly, perigonadal and subcutaneous fat were cut into small pieces, and the fragments were digested at 37°C with collagenase II (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) (1 mg/mL) in Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRBA) containing fatty acid free albumin (3%) and glucose (6 mM) at pH 7.4. After 45 min of incubation under continuous vigorous shaking, the fat cells were filtered through a nylon mesh and washed 3 times with KRBA to eliminate the stroma-vascular fraction and collagenase. The cells were counted in a Neubauer's chamber, and the viability was verified with trypan blue.

Lipogenesis in isolated adipocytes

Isolated adipocytes (10^6 cells) were incubated in triplicate in a Krebs-Ringer phosphate buffer containing 3% fatty acid-free BSA, 6 mM glucose, 1 mM acetate and 25 µU human insulin for 2 hours at 37°C and saturated with a gas mixture of CO₂ (5%) / O₂ (95%) in a shaking water bath. All aliquots were incubated with 1 µCi of ¹⁴C-acetate (GE Healthcare-Amersham, United Kingdom). After incubation, the mixture was acidified with 0.2 mL H₂SO₄ (8 N) and incubated for an additional 30 min. Then, the reaction mixture was treated with 2.5 mL of Dole's reagent (isopropanol: n-heptane: H₂SO₄, 4:1:0.25, v/v/v) for lipid extraction (30). The results are expressed as a percentage of the control group.

Lipolysis in isolated adipocytes

Glycerol release rates from adipocytes to media were measured as an index of lipolysis. The assay was performed in triplicate with Krebs-Ringer phosphate buffer containing 3% fatty acid-free BSA and 6 mM glucose, pH 7.4. Isolated adipocytes (10⁶ cells) were incubated with adenosine deaminase (0.2 U/ml) for 5 min in a shaking water bath at 37°C to allow for the degradation of endogenous released adenosine, which is a potent inhibitor of lipolysis (31). After this period, cells were incubated for 1.5 h at 37°C in the presence or absence of isoproterenol (10⁻⁵ M), a beta-adrenergic receptor agonist. At the end of the incubation, the reaction was blocked on ice, and cells were carefully removed. The glycerol content of the incubation medium was measured using an enzymatic-colorimetric assay (Bioclin, Quibasa; Belo Horizonte, Brazil). The results are expressed in mg/dL 10⁻⁶ cell.

In vivo lipolysis

Lipolysis was estimated as glycerol release in response to isoproterenol stimulation. Fed mice were injected intraperitoneally (IP) with isoproterenol (0.3 mg/kg) (32). Plasma samples were collected from the tail tip without anesthesia at basal time and 15 minutes after IP injection. The plasma glycerol content was measured using an enzymatic-colorimetric assay (Bioclin, Quibasa; Belo Horizonte, Brazil). The lipolysis index is defined as the ratio between the concentrations of glycerol after to before isoproterenol stimuli.

Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm standard error for the number of determinations (n) indicated. Student's t-test was used for two group comparisons. Statistical significance was defined as $p \le 0.05$.

Results

In a previous study, we reported that apo CIII transgenic mice accumulated more body fat than control non-transgenic littermate mice after consuming a high fat (HF) diet for 5 months after weaning (12). To understand the time course of this HF diet effect, we performed two studies feeding mice with a HF diet from 2 to 4 months of age and from 4 to 6 months of age. In the first study, we found that apo CIII and NTg mice did not differ in terms of body weight gain (**Fig. 1A**) and relative weight of white adipose tissue visible

depots (subcutaneous, perigonadal and perirenal) (**Fig. 1C**). However, the leptin plasma level, a better sensor for body fat, was markedly elevated (more than 3-fold) in apo CIII mice, indicating a greater whole body fat mass in apo CIII mice (**Fig. 1D**). During the experimental period, no significant differences in food intake (**Fig. 1B**), fat intake and excretion (measured in a three-day fat balance) were observed between apo CIII and NTg mice (**Table 1**). In addition, basal metabolism was measured as *in vivo* CO₂ production rates (**Fig. 1E**), which were similar between mice groups.

Although no differences in visible adiposity between groups were observed after the first 2 months of a HF diet, we evaluated the capacity of exogenous lipid retention and lipogenesis in adipose tissue. In fact, 24-hour retention of exogenous ³H-triolein (orally administered) in adipose tissue was increased 3-fold in apo CIII mice in both perigonadal (p=0.036) and subcutaneous (p=0.028) adipose depots, with no significant differences in liver or muscle ³H-triolein retention (**Fig. 2**). This greater adipose exogenous lipid retention was not due to higher tracer intestinal absorption because the amount of ³H-triolein found in feces was similar in both groups (111±30 vs. 122±19 x 10^3 cpm/g).

Because apo CIII mice had higher tissue capacity to store lipids but similar mass of the main visible adipose tissue depots when compared to NTg, we tested whether there was a compensatory decrease in lipid synthesis. Lipogenic rates were analyzed as ${}^{3}\text{H-H}_{2}\text{O}$ incorporation into lipids (**Fig. 3A and B**). Indeed, apo CIII mice showed significantly reduced *in vivo* lipogenesis in both perigonadal (p= 0.026) and subcutaneous (p= 0.056) adipose tissues but no alterations in liver lipogenesis (not shown). To confirm these findings, we measured lipogenesis in isolated adipocytes from both groups of mice. In agreement with the *in vivo* data, we found diminished lipogenesis in isolated adipocytes

from apo CIII mice perigonadal and subcutaneous adipose tissues (**Fig. 3C and D**). *De novo* lipogenesis in adipocytes was determined using acetate as a substrate because of its higher efficiency than 3 H₂O. Compared to NTg adipocytes, there was a marked reduction of approximately 70% in lipogenesis in both apo CIII fat depots, although the statistical significance was only marginal (p=0.064 for subcutaneous and p=0.068 for perigonadal depot) due to large data variability. Therefore, feeding a HF diet from 2 to 4 months of age did not affect apo CIII mice visible adipose tissue mass, most likely because at this age, the increased exogenous lipid retention capacity was compensated by a reduced lipogenesis rate in apo CIII adipose tissue.

Next, we investigated the effects of a HF diet on older mice, from 4 to 6 months of age. A HF diet did not change the apo CIII lipemic phenotype that is already present under a low fat diet (**Table 2**). The apo CIII mice maintained higher plasma levels of triglycerides (5-fold), cholesterol (~70%) and non-esterified fatty acids (NEFA, ~100%) when compared to NTg mice. Glycerol plasma levels did not differ between groups when in a fasting state. However, in the fed state, glycerol levels were higher in apo CIII than in Ntg mice. In addition, fasted and fed glycemia levels were similar in both groups (**Table 2**), as well as the glucose tolerance to an oral glucose load (data not shown).

Under HF diet feeding, 6-month old apo CIII mice developed greater visible adiposity than age matched NTg controls (**Fig. 4C**). The mass of the perigonadal, perirenal and subcutaneous fat depots of apo CIII mice were 26, 28 and 16% greater, respectively, than the respective NTg mice depots. The leptin plasma levels in apo CIII were two-fold higher than in NTg mice (**Fig. 4D**). Body weight, food intake and basal metabolism (CO₂ production) were similar between groups (**Fig. 4 A, B and E**).

We hypothesized that, in older mice, a continuous increased capacity of exogenous lipid retention verified in young apo CIII mice could be responsible for the higher adiposity. Surprisingly, at 6 months of age, apo CIII mice no longer showed increased exogenous lipid retention in adipose tissues (**Fig. 5**). Interestingly, adipose tissue lipid retention was markedly lower in both groups of older mice, apo CIII and NTg, compared to the young counterpart groups (**Fig. 5** *vs.* **Fig. 2**, respectively), while liver lipid retention rates were only mildly modified between the age groups.

Next, lipogenesis rates were determined in isolated adipocytes from apo CIII and NTg mice fed a HF diet from 4 to 6 months of age (**Fig. 6**). There were no significant differences in *de novo* lipid synthesis in adipocytes from the perigonadal and subcutaneous fat depots of apo CIII and control NTg mice.

Because neither exogenous lipid retention nor lipogenesis could explain the higher diet-induced adiposity in 6-month old apo CIII mice, we investigated adipose tissue lipolysis rates. Basal and isoproterenol-stimulated lipolysis in isolated adipocytes from perigonadal and subcutaneous fat depots are shown in **Figure 7**. Lipolysis was determined as glycerol release to the media. Basal lipolysis in subcutaneous adipocytes was significantly reduced by 55% in apo CIII compared to NTg adipocytes, but no differences were noted in perigonadal adipocytes. When lipolysis was maximally stimulated by isoproterenol, no significant differences were observed between adipocytes of both groups of mice. Therefore, the reduction in subcutaneous lipolysis could explain the increase in the mass of subcutaneous adipose tissue observed in apo CIII mice. To confirm and expand these results in a more physiological context, we also estimated lipolysis rates *in vivo*, by measuring plasma glycerol levels before (basal) and after isoproterenol stimulation. Because basal glycerol plasma levels reflect the pool from lipoprotein intravascular

metabolism and adipose tissue lipolysis, the response to isoproterenol stimulation must be normalized to the basal level of glycerol, which is higher in apo CIII mice (**Fig. 8A**). Therefore, the lipolysis index is expressed as the ratio between glycerol concentrations in the stimulated:basal states. It was verified that the isoproterenol response is significantly reduced by 40% in apo CIII transgenic mice (**Fig. 8C**).

Discussion

In this work, we examined the potential major mechanisms involved in the increased adiposity in response to a high fat diet previously observed in mice overexpressing apo CIII. In two studies performed in mice of different ages (4- and 6month-old mice), the body weight, food intake, fat excretion and whole body CO₂ production were similar between apo CIII and control mice. Therefore, the differences in the adiposity are most likely explained by local alterations in adipose tissue lipid metabolism. To comprehend the altered response of apo CIII mice to a HF diet, we measured tissue capacity to store exogenous lipids, lipogenesis rates and the ability of adipocytes to release fatty acids and glycerol (lipolysis). In young mice fed a HF diet for 2 months, a 3-fold increase in the exogenous lipid retention capacity was most likely counteracted by a reduction in *de novo* lipogenesis rates in apo CIII adipose tissues, minimizing differential effects on visible adipose tissue masses between the two groups of mice. However, total body fat mass must be greater in apo CIII mice, as indicated by their higher plasma leptin levels. When the HF diet was provided to older mice, from 4 to 6 months of age, the adiposity response to diet was quite different. While exogenous lipid retention capacity and lipogenesis rates were similar in both groups, the lipolysis rates were

significantly decreased in apo CIII mice, as measured in isolated adipocytes as well as *in vivo*, resulting in a greater mass of visible adipose tissue depots.

Although liver is the main lipogenic tissue, adipose tissue is also considered a relevant lipogenic organ in rodents, especially in obese mice (33, 34). Studies performed in both animals and humans suggest that an increase in lipid accumulation in visceral adipocytes enhances lipolysis, resulting in higher plasma free fatty acid levels, which can lead to insulin resistance and metabolic syndrome complications (35-37). Conversely, other studies have shown that obesity can be responsible for lipolytic resistance to catecholamines, especially in subcutaneous adipose tissue (37-39). In accordance with that, our study demonstrated that the fatter apo CIII mice have impaired basal lipolysis and lipolytic response to catecholamines.

Lipoprotein lipase (LPL) activity, a key enzyme that provides NEFA from plasma lipoproteins to tissues, is positively correlated with adipogenesis and obesity (40). In fact, several studies indicate that modulation of LPL activity through its activators or inhibitors is related to obesity. Apo CI transgenic mice present lower LPL activity and are protected against the development of genetic obesity (8). Apo CIII is considered an endogenous LPL inhibitor (41). Ebara et al. (42) have shown an inhibitory effect of apo CIII mice plasma on *in vitro* LPL activity. This effect is interpreted as a mechanism to explain the hypertriglyceridemia in these mice. However, Aalto-Settala et al. (23) have shown that VLDL from apo CIII and NTg mice are equally hydrolyzed *in vitro* by LPL. In addition, we have shown similar levels of post heparin plasma LPL activity in apo CIII and NTg mice (43). Although apo CIII knockout mice were more prone to diet-induced obesity (9), the apo CIII overexpressing mice studied here also respond more intensely to diet-induced obesity than controls. If LPL was inhibited in the adipose tissue of apo CIII mice, the

availability of NEFA to adipose tissues would be reduced, and increased adiposity would not be possible as shown here and previously (12). The levels of NEFA are actually increased in apo CIII mice, showing greater availability of this substrate to all body tissues. Therefore, we rule out a major role of LPL to explain increased HF diet-induced adiposity in apo CIII mice.

Our results indicate that adipose tissue lipid metabolism can be quite different depending on the age in which animals are exposed to a HF diet. While lipogenesis and exogenous lipid retention are more important to define fat mass accumulation in younger mice, reduced lipolysis rates are essential to determine increases in adipose mass in older mice. Accordingly, a study with young and middle-aged healthy Caucasian men showed significantly higher fat accumulation and lower rates of stimulated lipolysis in adipose tissue of middle-aged compared to younger subjects (44). In addition, Ursini et al. (45) showed that the increased fat mass that occurs with aging results from decreased rates of lipolysis and increased LPL activity in the adipose tissue of aged Wistar rats. It is of interest to mention that apo CIII mRNA expression is increased in aged C57Bl/6n x DBA/2N hybrid mice (46).

The specific molecular pathways underlying the induction of fat accumulation by overexpression of apo CIII were not evaluated in this study. It is well known that fatty acids can modulate intracellular signaling pathways by changing cell membrane fluidity, the composition of lipid rafts and second messenger production. In addition, they can act on receptors either in the cell membrane or in the nucleus, such as the toll-like receptors (TLRs) and the peroxisome-proliferator-activated receptors (PPARs). We could speculate that apo CIII induced high NEFA availability to tissues, including adipose tissues, or could
modulate specific protein activities or gene expression related to adipogenesis, lipid accumulation and lipolysis in the adipose tissue of apo CIII mice.

In conclusion, our results indicate that apo CIII overexpression exacerbates high fat diet-induced adiposity by promoting age-dependent differential effects on adipose tissue lipid metabolism, namely, stimulation of exogenous lipid storage at early ages and repression of lipolysis at late ages.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Instituto Nacional de Obesidade e Diabetes (CNPq/Fapesp). Raposo HF and Kato LS were supported by FAPESP fellowships. We are especially grateful to the technical assistance of Luiz Fernando da Silva Batista.

References

- 1. Kopelman, P. G. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature*. 6;404(6778):635-43.
- 2. Reaven, G. M. 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 37:1595–1607.
- 3. Ten, S., and N. Maclaren. 2004. Insulin resistance syndrome in children. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6):2526-39.
- Isomaa, B., P. Almgren, T. Tuomi, B. Forsen, K. Lahti, M. Nissen, M. R. Taskinen, and L. Groop. 2001. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 24(4):683-9.
- 5. Whitlock, G., S. Lewington, P. Sherliker, R. Clarke, J. Emberson, J. Halsey, N. Qizilbash, R. Collins, R. Peto, et al., 2009. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 28;373(9669):1083-96.
- Coutinho, T., K. Goel, D. Corrêa de Sá, C. Kragelund, A. M. Kanaya, M. Zeller, J. S. Park, L. Kober, C. Torp-Pedersen, Y. Cottin, L. Lorgis, S. H. Lee, Y. J Kim, R. Thomas, V. L. Roger, V. K. Somers, and F. Lopez-Jimenez. 2011. Central obesity and survival in subjects with coronary artery disease: a systematic review of the literature and collaborative analysis with individual subject data. *J Am Coll Cardiol.* 10;57(19):1877-86.
- 7. Watson, K. E., B. N. Horowitz, G. Matson. 2003. Lipid abnormalities in insulin resistant states. *Rev Cardiovasc Med*. 4(4):228-36.
- 8. Jong, M. C., Rensen PC, Dahlmans VE, van der Boom H, van Berkel TJ, Havekes LM. 2001. Apolipoprotein C-III deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wildtype and apoE knockout mice. *J Lipid Res.* 42(10):1578-85.
- Duivenvoorden, I., B. Teusink, P. C. Rensen, J. A. Romijn, L. M. Havekes, and P. J. Voshol PJ. 2005. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. *Diabetes*. 54: 664–671.
- 10. Huang, Z. H., Reardon CA, Mazzone T. 2006. Endogenous ApoE expression modulates adipocyte triglyceride content and turnover. *Diabetes*. 55: 3394–3402.
- Gao, J., H. Katagiri, Y. Ishigaki, T. Yamada, T. Ogihara, J. Imai, K. Uno, Y. Hasegawa, M. Kanzaki, T. T. Yamamoto, S. Ishibashi, and Y. Oka. 2007. Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation and insulin resistance. *Diabetes*. 56(1):24-33.
- Salerno, A. G., T. R. Silva, M. E. C. Amaral, L. C. Alberici, M. L. Bonfleur, P. R. Patrício, E. P. M. S. Francesconi, D. M. Grassi-Kassisse, A. E. Vercesi, A. C. Boschero, and H. C. F. Oliveira. 2007. Overexpression of apolipoprotein CIII increases and CETP reverses diet-induced obesity in transgenic mice. *Int J Obes (Lond).*. 31(10):1586-95.

- 13. Hofmann, S. M., D. Perez-Tilve, T. M. Greer, B. A. Coburn, E. Grant, J. E. Basford, M. H. Tschöp, and D. Y. Hui. 2008. Defective lipid delivery modulates glucose tolerance and metabolic response to diet in apolipoprotein E-deficient mice. *Diabetes*. 57(1):5-12.
- 14. Wang, J., X. D. Perrard, J. L. Perrard, A. Mukherjee, C. Rosales, Y. Chen, C. W. Smith, H. J. Pownall, C. M. Ballantyne, and H. Wu. 2012. ApoE and the role of very low density lipoproteins in adipose tissue inflammation. *Atherosclerosis*. 223(2):342-9.
- 15. Schonfeld, G., P. K. George, J. Miller, P. Reilly, and J. Witztum. 1979. Apolipoprotein C-II and C-III levels in hyperlipoproteinemia. *Metabolism*. 28(10):1001-10.
- 16. Kashyap, M. L., L. S. Srivastava, B. A. Hynd, P. S. Gartside, and G. Perisutti. 1981. Quantitation of human apolipoprotein C-III and its subspecie by radioimmunoassay and analytical isoelectric focusing: abnormal plasma triglyceride-rich lipoprotein apolipoprotein C-III subspecie concentrations in hypertriglyceridemia. J Lipid Res. 22(5):800-10.
- Fredenrich, A., L. M. Giroux, M. Tremblay, L. Krimbou, J. Davignon, and J. S. Cohn. 1997. Plasma lipoprotein distribution of apoC-III in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects: comparison of the apoC-III to apoE ratio in different lipoprotein fractions. *J Lipid Res*. 38(7):1421-32.
- Forte, T. M., A. V. Nichols, R. M. Krauss, R. A. Norum. 1984. Familial apolipoprotein AI and apolipoprotein CIII deficiency. Subclass distribution, composition, and morphology of lipoproteins in a disorder associated with premature atherosclerosis. *J Clin Invest*.74(5):1601-13.
- 19. von Eckardstein, A., H. Holz, M. Sandkamp, W. Weng, H. Funke, and G. Assmann. 1991. Apolipoprotein C-III(Lys58----Glu). Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Invest*. 87(5):1724-31.
- 20. Sacks, F. M., P. Alaupovic, L. A. Moye, T. G. Cole, B. Sussex, M. J. Stampfer, M. A. Pfeffer, and E. Braunwald. 2000. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation*, 102:1886-1892.
- 21. Alaupovic, P., W. J. Mack, C. Knight-Gibson, and H.N. Hodis. 1997. The role of triglyceride-rich lipoprotein families in the progression of atherosclerotic lesions as determined by sequential coronary angiography from a controlled clinical trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17:715-722.
- 22. Ito, Y., N. Azrolan, A. O'Connell, A. Walsh, and J. L. Breslow. 1990. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science*. 249:790–793.
- 23. Aalto-Setala, K., E. A. Fisher, X. Chen, T. Chajek-Shaul, T. Hayek, R. Zechner, A. Walsh, R. Ramakrishnan, H.N. Ginsberg, and J.L. Breslow. 1992. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J Clin Invest*. 90:1889–900.

- 24. Aalto-Setala, K., P. H. Weinstock, C. L. Bisgaier, L. Wu, J. D. Smith, and J. L. Breslow. 1996. Further characterization of the metabolic properties of triglyceride-rich lipoproteins from human and mouse apoC-III transgenic mice. *J Lipid Res.* 37: 1802–1811.
- 25. Walsh, A., N. Azrolan, K. Wang, A. Marcigliano, A. O'Connell, and J. L. Breslow. 1993. Intestinal expression of the human apoA-I gene in transgenic mice is controlled by a DNA region 3' to the gene in the promoter of the adjacent convergently transcribed apoC-III gene. *J Lipid Res* 34: 617-623.
- 26. Alberici, L. C., H. C. Oliveira, P. R. Patrício, A. J. Kowaltowski, and A. E. Vercesi. 2006. Hyperlipidemic mice present enhanced catabolism and higher mitochondrial ATP-sensitive K+ channel activity. *Gastroenterology*. 131(4):1228-34.
- 27. Folch, J., M. Less, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol Chem.* 226(1):497-509.
- 28. Osono, Y., L. A. Woollett, J. Herz, and J. M. Dietschy. 1995. Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. *J. Clin. Invest*. 95(3): 1124-32.
- 29. Rodbell, M. 1964. Metabolism of isolated fat cells. J. Biol. Chem. 239, 375–380.
- 30. Dole, V. P., and H. Meinertz. 1960. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. J. Biol Chem. 235(9):2595-2599.
- Honnor, R. C., G. S. Dhillon, and C. Londos C. 1985. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. Cell preparation, manipulation, and predictability in behavior. *J Biol Chem*. 200:15122–15129.
- Osuga, J., S. Ishibashi, T. Oka, H. Yagyu, R. Tozawa, A. Fujimoto, F. Shionoiri, N. Yahagi, F. B. Kraemer, O. Tsutsumi, N. Yamada. 2000. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 18;97(2):787-92.
- 33. Hems, D. A., E. A. Rath, and T. Verrinder. 1975. Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of normal and genetically obese (ob/ob) mice during the 24-hour cycle. *Biochem J.* 150(2):167-73.
- Bruss, M. D., C. F. Khambatta, M. A. Ruby, I. Aggarwal, and M. K. Hellerstein. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. 2010. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298(1):E108-16.
- 35. Scheen, A. J., and F. H. Luyckx FH. Obesity and liver disease. 2002. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 16(4):703-16.
- 36. Stich, V., and M. Berlan. 2004. Physiological regulation of NEFA availability: lipolysis pathway. *Proc Nutr Soc*. 63(2):369-74.

- 37. Gaidhu, M. P., N. M. Anthony, P. Patel, T. J. Hawke, and R. B. Ceddia. 2010. 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(4):C961-71.
- Bougneres, P.,C. L. Stunff, C. Pecqueur, E. Pinglier, P. Adnot, and D. Ricquier. 1997. *In vivo* resistance of lipolysis to epi-nephrine. A new feature of childhood onset obesity. *J Clin.Invest*. 99, 2568–2573.
- 39. Jensen, M. D. 1997. Lipolysis: contribution from regional fat. Annu Rev Nutr. 17, 127–139.
- 40. Voshol, P. J., P. C. Rensen, K. W. van Dijk, J. A. Romijn, and L. M. Havekes. 2009. Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: studies using genetically engineered mouse models. Biochim Biophys Acta. 1791(6):479-85.
- 41. van Dijk, K. W., P. C. Rensen, P. J. Voshol, and L. M. Havekes. 2004. The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism? *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 239–246.
- 42. Ebara, T., R. Ramakrishnan, G. Steiner, and N. S. Shachter. 1997. Chylomicronemia due to apolipoprotein C-III overexpression in apolipoprotein E-null mice: apolipoprotein C-III-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apoE. *J Clin Invest.* 99: 2672–2681.
- 43. Bighetti, E.J., P.R. Patrício, A. C. Casquero, J. A. Berti, and H. C. Oliveira. 2009. Ciprofibrate increases cholesteryl ester transfer protein gene expression and the indirect reverse cholesterol transport to the liver. *Lipids Health Dis*. 23;8:50.
- 44. Imbeault, P., H. Vidal, A. Tremblay, N. Vega, A. Nadeau, J. P. Després, P. Mauriège. 2001. Agerelated differences in messenger ribonucleic acid expression of key proteins involved in adipose cell differentiation and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(2):828-33.
- 45. Ursini, F., M. Vugman, L. C. Fernandes, C. M. Curi, R. Curi. 1991. Metabolic changes of several adipose depots as caused by aging. *Physiol Behav*. 50(2):317-21.
- 46. Araki, S., M. Okazaki, and S. Goto. 2004. Impaired lipid metabolism in aged mice as revealed by fasting-induced expression of apolipoprotein mRNAs in the liver and changes in serum lipids. *Gerontology*; 50:206–215.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Body weight (A), food intake (B), relative weight of adipose tissue depots and liver (C) (n=21), plasma levels of leptin (D) and body CO_2 production rates (E) (n=6) of female non-transgenic (NTg) and apo CIII transgenic (Tg) mice fed a high fat (HF) diet for eight weeks. Mean ± SE. Student's t test: * *P*<0.05.

Figure 2. *In vivo* lipid retention in perigonadal and subcutaneous adipose, liver and muscle tissues. ³H-oleic acid tissue retention 24 hours after an oral dose of ³H-triolein (5 μ Ci ³H-triolein, 180 mg/mouse) of 4-month-old female non-transgenic (NTg) and apo CIII Tg mice fed a high fat diet for 8 weeks. Mean ± SE (n= 7-8 per group). Student's t test, * *P*< 0.05.

Figure 3: Lipogenesis rates in 4-month-old female non-transgenic (NTg) and apo CIII Tg mice fed a high fat diet for 8 weeks. *In vivo* lipogenesis in perigonadal (A) and subcutaneous (B) adipose depots measured as ${}^{3}\text{H}_{2}\text{O}$ incorporation into lipids. *In vitro* lipogenesis in isolated adipocytes from perigonadal (C) and subcutaneous (D) depots measured as ${}^{14}\text{C}$ -acetate incorporation into lipids. See Materials & Methods for details. Mean \pm SE (n= 6-7). Student's t test, * *P*< 0.05 and # *P*<0.07.

Figure 4: Body weight (A), food intake (B), relative weight of adipose tissue depots and liver (C) (n=17-20), plasma leptin levels (D) (n=13) and body CO₂ production rates (E) (n=4) of 6-month-old female non-transgenic (NTg) and apo CIII Tg mice, fed a high fat diet for 8 weeks. Mean \pm SE. Student's t test, * *P*< 0.05 and # *P*<0.07.

Figure 5. *In vivo* lipid retention in perigonadal and subcutaneous adipose, liver and muscle tissues. ³H-oleic acid tissue retention 24 hours after an oral dose of ³H-triolein (5 μ Ci ³H-triolein, 180 mg/mouse) of 6-month-old female non-transgenic (NTg) and apo CIII Tg mice fed a high fat diet for 8 weeks. Mean ± SE (n=4-5 per group).

Figure 6: *In vitro* lipogenesis in isolated adipocytes from perigonadal and subcutaneous adipose tissues of 6-month-old female non-transgenic (NTg) and apo CIII Tg mice fed a high fat diet for 8 weeks (10^6 cells, 1 µCi ¹⁴C-acetate, 10 nM acetate, 25 µU insulin, 6 mM glucose, 2 hours, 37°C). Mean ± SE (three independent experiments, pool of triplicates, 4 animals/pool).

Figure 7: *In vitro* adipocyte lipolysis: basal and isoproterenol-stimulated lipolysis measured as glycerol release from isolated adipocytes from perigonadal and subcutaneous adipose tissue of 6-month-old female non-transgenic (NTg) and apo CIII Tg mice fed a high fat diet for 8 weeks. (10^6 cells, 0.2 U/ml adenosine deaminase, with or without isoproterenol (10^{-5} M), 1.5 hours, 37° C). Mean \pm SE (two independent experiments, pool of triplicates, 4 animals/pool). Student's t test, * $P \le 0.01$.

Figure 8. Plasma glycerol levels and *in vivo* lipolysis index (ratio between glycerol plasma levels in isoproterenol-stimulated and basal conditions). Mean \pm SE. Student's t test, * $P \leq 0.05$.

	NTg	CIII
Food intake	2.9 ± 0.16	2.9 ± 0.03
Fat intake	0.8 ± 0.04	0.8 ± 0.01
Fecal mass	0.42 ± 0.03	0.40 ± 0.02
Fat excretion (% dry feces)	4.0 ± 0.36	4.4 ± 0.03

 Table 1. Fat intake and excretion (g/day/mouse) in 4-month-old non-transgenic (NTg) and apo CIII

 transgenic mice fed a high fat diet for 8 weeks.

Mean \pm SE (n=6).

		NTg	CIII
CHOL (mg/dL)	Fed	171 ± 11.3 (6)	288 ± 36.7 ** (7)
TG (mg/dL)	Fed	52 ± 5.6 (6)	341 ± 54.4 ** (7)
NEFA (nmol/L)	Fed	0.7 ± 0.06 (6)	1.3 ± 0.04 ** (7)
Glycerol (mg/dL)	Fast	3.0 ± 0.2 (8)	3.1 ± 0.2 (6)
	Fed	2.5 ± 0.3 (8)	$3.6 \pm 0.3 * (6)$
GLUC (mg/dL)	Fast	102.4 ± 4.8 (13)	107.6 ± 3.6 (15)
	Fed	107.6 ± 3.6 (13)	114.8 ± 3.6 (15)

Table 2. Plasma levels of lipids and glucose in 6-month-old female non-transgenic (NTg) and apo CIII transgenic mice fed a high fat diet for 8 weeks.

Triacylglycerol (TG), Cholesterol (CHOL) and Non-esterified fatty acid (NEFA). Mean \pm SE (n). Student's t test, * $P \le 0.05$ ** $P \le 0.01$ for CIII vs NTg.



Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6



Fig.7



Fig. 8

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Doutorado intitulada Estudo dos mecanismos envolvidos na redução de adiposidade de camundongos que super-expressam a proteína de transferência de colesteril éster (CETP)"

() 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):

(X) CIBio - Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. 2008/02, Instituição: IB-UNICAMP.

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 1607-1, Instituição:

CEEA/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.

Alund: (Helena Fonseca Raposo)

Orientador: (Helena C. F. De Oliveira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

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

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI Presidente da Comissão Interna de Biossegurança Instituto de Biologia UNICAMP

Anexo 3 Resumos dos artigos publicados dursnte o doutorado

Br J Nutr. 2012 Sep 28;108(6):1042-51. doi: 10.1017/S0007114511006180. Epub 2011 Dec 12.

A soyabean diet does not modify the activity of brown adipose tissue but alters the rate of lipolysis in the retroperitoneal white adipose tissue of male rats recovering from early-life malnutrition.

Paiva AA, Faiad JZ, Taki MS, de Lima Reis SR, de Souza LM, Dos Santos MP, Chaves VE, Kawashita NH, Oliveira HC, Raposo HF, Carneiro EM, Latorraca MQ, Gomes-da-Silva MH, Martins MS.

Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

Abstract

Nutritional recovery with a soyabean diet decreases body and fat weights when compared with a casein diet. We investigated whether the reduced adiposity observed in rats recovering from early-life malnutrition with a soyabean diet results from alterations in lipid metabolism in white adipose tissue (WAT) and/or brown adipose tissue (BAT). Male rats from mothers fed either 17 or 6 % protein during pregnancy and lactation were maintained on 17 % casein (CC and LC groups), 17 % soyabean (CS and LS groups) or 6 % casein (LL group) diets over 60 d. The rats maintained on a soyabean diet had similar relative food intakes, but lower body and retroperitoneal WAT weights and a reduced lipid content in the retroperitoneal WAT. The insulin levels were lower in the recovered rats and were elevated in those fed a soyabean diet. Serum T3 concentration and uncoupling protein 1 content in the BAT were decreased in the recovered rats. The thermogenic capacity of the BAT was not affected by the soyabean diet. The lipogenesis rate in the retroperitoneal WAT was similar in all of the groups except for the LL group, which had exacerbated lipogenesis. The enhancement of the lipolysis rate by isoproterenol was decreased in white adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was elevated in adipocytes from the soyabean-recovered rats and was

Lab Invest. 2011 Feb;91(2):232-40. Epub 2010 Aug 30.

Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis.

Zecchin KG, Rossato FA, Raposo HF, Melo DR, Alberici LC, Oliveira HC, Castilho RF, Coletta RD, Vercesi AE, Graner E.

Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Abstract

Fatty acid synthase (FASN) is the metabolic enzyme responsible for the endogenous synthesis of the saturated long-chain fatty acid, palmitate. In contrast to most normal cells, FASN is overexpressed in a variety of human cancers, including cutaneous melanoma, in which its levels of expression are associated with tumor invasion and poor prognosis. We have previously shown that FASN inhibition with orlistat significantly reduces the number of spontaneous mediastinal lymph node metastases following the implantation of B16-F10 mouse melanoma cells in the peritoneal cavity of C57BL/6 mice. In this study, we investigate the biological mechanisms responsible for the FASN inhibition-induced apoptosis in B16-F10 cells. Both FASN inhibitors, cerulenin and orlistat, significantly reduced melanoma cell proliferation and activated the intrinsic pathway of apoptosis, as demonstrated by the cytochrome c release and caspase-9 and -3 activation. Further, apoptosis was preceded by an increase in both reactive oxygen species production and cytosolic calcium concentrations and independent of p53 activation and mitochondrial permeability transition. Taken together, these findings demonstrate the mitochondrial involvement in FASN inhibition-induced apoptosis in melanoma cells.

Int J Cancer. 2008 Dec 1;123(11):2557-65.

Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model.

Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel AL, Veiga SS, Raposo HF, Oliveira HC, Loda M, Coletta RD, Graner E.

Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, Sao Paulo, Brazil.

Abstract

Fatty acid synthase (FASN) is the enzyme responsible for the endogenous synthesis of the saturated fatty acid palmitate. In contrast to most normal cells, malignant cells depend on FASN activity for growth and survival. In fact, FASN is overexpressed in a variety of human cancers including cutaneous melanoma, in which its levels of expression are associated with a poor prognosis and depth of invasion. Here, we show that the specific inhibition of FASN activity by the antiobesity drug Orlistat or siRNA is able to significantly reduce proliferation and promote apoptosis in the mouse metastatic melanoma cell line B16-F10. These results prompted us to verify the effect of FASN inhibition on the metastatic process in a model of spontaneous melanoma metastasis, in which B16-F10 cells injected in the peritoneal cavity of C57BL/6 mice metastasize to the mediastinal lymph nodes. We observed that mice treated with Orlistat 48 hr after the inoculation of B16-F10 cells exhibited a 52% reduction in the number of mediastinal lymph node metastases, in comparison with the control animals. These results suggest that FASN activity is essential for B16-F10 melanoma cell proliferation and survival while its inactivation by Orlistat significantly reduces their metastatic spread. The chemical inhibition of FASN activity could have a potential benefit in association with the current chemotherapy for melanoma.