

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Valéria Wolf Nunes

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

EFEITO DO TRATAMENTO COM INFUSO DE *Croton cajucara* Benth EM
RATOS WISTAR JOVENS E ADULTOS NORMO- OU
HIPERLIPIDÊMICOS.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Valéria Wolf Nunes
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do Título
de Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, área de Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Célia Spadari-Bratfisch

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

Campinas

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	N922e
V	EX
TOMBO BC/	64983
PROC.	16-P-00086/05
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$11,00
DATA	25-07-05
Nº CPD	

ii

Bit ID 359429

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

N922e

Nunes, Valéria Wolf

Efeito do tratamento com infuso de *Croton cajucara* Benth em ratos wistar jovens e adultos normo-ou hiperlipidêmicos / Valéria Wolf Nunes.--
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch

Co- orientadora: Maria Grassi-Kassisse

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1.Tecido adiposo. 2. Croton. 3. Ratos. I. Spadari-Bratfisch, Regina Célia .
II. Grassi-Kassisse, Dora Maria. III. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. IV. Título.

Data da Defesa: 07/06/2004

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch (Orientadora) RpC

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira Helena C. Franco de Oliveira

Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes Domingos Sávio Nunes

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima Clélia Akiko Hiruma Lima

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito Alba Regina Monteiro Souza Brito

Profa. Dra. Sarah Arana _____

Profa. Dra. Eneida de Paula _____

200515501

Ao César,
A caminhada fica mais leve ao seu lado,
com seu apoio e carinho, constantes.
Muito obrigada.

Ao Henrique e Eduardo,
Vocês são a concretização do amor em minha vida.
Muito obrigada.
Amo vocês!

Aos meus pais, Lúcia e João,
Por confiarem em mim e em meus sonhos.
Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch, minha orientadora, pela competência, paciência e empenho na realização deste trabalho.
Muito obrigada!

Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse, minha co-orientadora, pela competência, paciência, dedicação e esforços, arduamente gastos com a minha formação. Muito obrigada!

AGRADEÇO TAMBÉM:

Profa. Sarah Arana, pela humildade e valiosa contribuição nos resultados desta tese. Muito obrigada!

Profa. Dra. Regina Scivoletto, minha amiga de vida e coração, pelo apoio ao longo destes anos. Você é muito especial!

Aos amigos Rita e Alexandre, pela amizade, apoio e companheirismo conquistados a cada dia.

Aos colegas de laboratório: André, Elisângela, Esméria, Elaine, Fernanda Klein, Iraídes, Josi, Juliana, Márcia, Marília, Mércia, Natália, Rodrigo, Sílvia, pela feliz convivência.

Aos funcionários do departamento, Alexandra, Ivo, D.Cida, D.Zefa, srs. Machado e Chico.

Aos laboratórios de química, bioquímica, histologia e faculdade de engenharia de alimentos da UNICAMP, que tanto colaboraram para o engrandecimento desta tese.

À FAPESP e a FAEP pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	PÁGINAS
Resumo	VIII
Abstract	IX
Lista de Abreviações	X
Lista de Tabelas	XII
Lista de Figuras	XVI
Lista de Materiais	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Classificação dos lípides</i>	1
1.2. <i>Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas</i>	2
1.3. <i>Dislipidemias e seu tratamento</i>	5
1.4. <i><u>Croton cajucara Benth</u></i>	8
1.5. <i>A célula adiposa</i>	10
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODO	15
3.1. <i>Animais</i>	15
3.2. <i>Grupos experimentais</i>	15
3.2.1. <i>Ratos normolipidêmicos (N)</i>	15
3.2.2. <i>Ratos hiperlipidêmicos (H)</i>	16
3.3. <i>Preparo do infuso a partir das cascas de <u>Croton cajucara Benth</u></i>	17
3.4. <i>Coleta de sangue</i>	17
3.5. <i>Retirada de órgãos e tecidos</i>	18
3.6. <i>Avaliação das concentrações sanguíneas</i>	18
3.6.1. <i>Colesterol total</i>	18
3.6.2. <i>Lipoproteínas</i>	19
3.6.3. <i>Triacilgliceróis</i>	20
3.6.4. <i>Glicose</i>	21
3.6.5. <i>Leptina</i>	21
3.6.6. <i>Insulina</i>	21
3.7. <i>Índice aterogênico</i>	21
3.8. <i>Sensibilidade de adipócitos isolados de ratos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados ou não com infuso de <u>Croton cajucara Benth</u>.</i>	22
3.8.1. <i>Preparo dos adipócitos e protocolo de incubação</i>	22
3.8.2. <i>Medida da lipólise</i>	23
3.8.3. <i>Medida enzimática do glicerol</i>	24
3.8.4. <i>Extração de lipídios</i>	24
3.8.5. <i>Análise dos resultados</i>	24
3.9. <i>Histologia do tecido hepático</i>	25
3.10. <i>Análise estatística</i>	26
4. RESULTADOS	27
4.1. <i>Efeito do tratamento com infuso a 5% de <u>Croton cajucara Benth</u> em ratos adultos normolipidêmicos</i>	28
4.1.1. <i>Peso corporal, consumo de ração e de líquido</i>	28
4.1.2. <i>Concentrações plasmáticas de colesterol total, triacilgliceróis e glicose</i>	30
4.1.3. <i>Sensibilidade aos agonistas β-adrenérgicos em adipócitos epididimais</i>	31

4.1.3. Sensibilidade aos agonistas β -adrenérgicos em adipócitos epididimais	31
4.2. Indução da hiperlipidemia em ratos por ingesta de dieta com alto teor de lipídio (15%).	39
4.3. Efeito do tratamento com o infuso a 5 ou a 10% de <u>Croton cajucara</u> em ratos jovens normo- e hiperlipidêmicos	39
4.3.1. Peso corporal, consumo de ração e de líquido	39
4.3.2. Dosagens séricas e índice aterogênico	44
4.3.3. Panículos adiposos epididimal, peri-renal e mesentérico	50
4.3.4. Fígado e adrenais	53
4.3.5. Sensibilidade aos agonistas β -adrenérgicos em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens submetidos ou não ao tratamento com infuso a 5 ou a 10% obtido das cascas de <u>Croton cajucara</u> Benth durante 15 dias em substituição à água de beber	56
4.3.5.1. Ratos jovens normolipidêmicos tratados ou não com infuso a 5%	58
4.3.5.2. Ratos jovens normolipidêmicos ou hiperlipidêmicos tratados ou não com infuso a 10%	65
4.3.6. Análise histológica do fígado de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados ou não com infuso a 10% de <u>Croton cajucara</u> Benth	76
5- DISCUSSÃO	78
6- CONCLUSÕES	91
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

Resumo

O infuso preparado das cascas de *Croton cajucara* é usado na medicina popular para o tratamento de dislipidemias, hiperglicemia, desordens gastrointestinais e hepáticas e também como terapia auxiliar em regimes de emagrecimento. Ausência de ganho de peso foi observada em ratos adultos normolipidêmicos tratados com infuso na concentração de 5%; além de reduções significativas nas concentrações plasmáticas de colesterol total e glicose. Em adipócitos isolados destes animais a lipólise basal não foi alterada, mas houve aumento na resposta lipolítica a agonistas não seletivos β -adrenérgicos (isoprenalina e adrenalina). Este efeito sugere aumento do papel da adrenalina como estimulador endógeno da lipólise, o que poderia contribuir para a ausência de ganho de peso. Aumento na sensibilidade à adrenalina foi também observado em adipócitos de ratos jovens tratados com infuso na concentração de 10%. Porém, este efeito não pode ser correlacionado a alterações no peso corporal, provavelmente porque os ratos ainda se encontravam em fase de crescimento. A administração de dieta hiperlipídica a ratos jovens não alterou o peso corporal, embora a ingesta alimentar e calórica desse grupo de ratos tenha sido significativamente inferior àquela apresentada pelo grupo normolipidêmico. O tratamento com infuso a 10% acentuou significativamente a diminuição na ingesta. Ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento significativo no peso do fígado e dos pâncreas e dos depósitos adiposos epididimal e peri-renal; o tratamento com o infuso a 10% não alterou este quadro. Em adipócitos de ratos hiperlipidêmicos comparados a adipócitos de ratos normolipidêmicos observamos: menor lipólise basal e maior sensibilidade à isoprenalina e à adrenalina, com redução de resposta máxima à isoprenalina e noradrenalina. O tratamento com infuso a 10% não modificou nenhum dos efeitos da dieta sobre a lipólise, exceto a resposta máxima à adrenalina que foi recuperada. Nós concluímos que o efeito da dieta sobre a redução da lipólise basal pode estar contribuindo de maneira importante para o aumento do peso no pâncreas adiposo epididimal dos ratos. Ao final do tratamento com a dieta hiperlipídica os ratos apresentaram aumento significativo nas concentrações séricas de colesterol total, LDL, VLDL, triacilgliceróis e insulina. O tratamento com o infuso a 10% não alterou este perfil sérico. O índice aterogênico, significativamente elevado em ratos hiperlipidêmicos, permaneceu inalterado em ratos hiperlipidêmicos tratados com o infuso a 10%. Ratos jovens hiperlipidêmicos apresentaram esteatose hepática com ou sem o tratamento com o infuso a 10%. A esteatose hepática pode, de alguma forma, estar contribuindo para a ausência dos efeitos do tratamento do infuso a ratos hiperlipidêmicos. Nós concluímos que os efeitos do infuso de *Croton cajucara* Benth, dependem da idade/peso dos ratos e da integridade do tecido hepático.

Abstract

The infuse prepared with the barks of *Croton cajucara* is used in folk medicine for treatment of dyslipidemias, hypertriglyceridemia, hepatic and gastrointestinal disorders as well as adjuvant in weight-loss program. Adult normolipidemic rats treated with 5% infuse of *C. cajucara* showed no weight gain and significant reduction in the total cholesterol and glucose plasma levels. Basal lipolysis was not altered in adipocytes isolated from rats treated with infuse but adipose cells were supersensitive to isoprenaline and adrenaline. This effect suggests an increased role played by adrenaline stimulating lipolysis and avoiding weight gain. Supersensitivity to adrenaline was also observed in adipocytes from young rats treated with 10% *C. cajucara* infuse, although rats showed normal weight gain as opposed to adult rats. Young rats fed with a high-fat diet reduced the amount of food and caloric intake with no alteration on body weight gain. Treatment with 10% *C. cajucara* infuse additionally reduced food intake. The high-fat diet also induced significant increase in the weight of the liver, epididymal and perirenal adipose depots. In adipocytes from hyperlipidemic rats compared to normolipidemic rats, the basal lipolysis and maximum responses to isoprenaline and adrenaline were decreased but the sensitivity to these agonists was increased. Adipocytes from hyperlipidemic rats treated with *C. cajucara* infuse did not change any of these parameters except for the maximum response to adrenaline that was recovered. Those results suggest that in rats feeding hyperlipidemic diet the reduced basal and maximum lipolysis may contribute to the epididymal adipose tissue depot weight increase. The hyperlipidemic diet also induced significant increase in the total cholesterol, VLDL, LDL, triacylglycerol and insulin seric levels. This effect was not modified by the infuse treatment. The atherogenic index, significantly higher in hyperlipidemic rats remained unaltered after infuse treatment. The liver steatosis may contribute to the absence of the infuse effects in hyperlipidemic rats. We conclude that the effect of the infuse of *C. cajucara* Benth. depend on the rats age and/or weight as well as the hepatic tissue integrity.

Lista de Abreviações

β_1 - AR	Adrenoceptor do subtipo beta 1
β_2 - AR	Adrenoceptor do subtipo beta 2
β_3 - AR	Adrenoceptor do subtipo beta 3
AH	Rato adulto hiperlipidêmico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AN	Rato adulto normolipidêmico
ANA	Rato adulto normolipidêmico que ingeriu água
ANI	Rato adulto normolipidêmico que ingeriu infuso
ANI-10	Rato adulto normolipidêmico que ingeriu infuso a 10%
ANI-5	Rato adulto normolipidêmico que ingeriu infuso a 5%
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BRL37344	Ácido(R*,R*)-(±)-4-[2-[(2-(3-clorofenil)-2-hidroxietyl)amino]propil]fenoxiacético
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CETP	Proteína de transferência do éster de colesterol
CGP12177A	Hidrocloreto de 4-[3-[(1,1-dimetil)amino]2-hidroxiopropoxi]-1,3-dihidro - 2H-benzimidazol-2-ona
CT	Colesterol total
GDH	Glicerofosfato desidrogenase
Gi	Proteína G inibitória
GK	Gliceroquinase
GR	Receptor de glicocorticóide
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina eosina
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxietyl] piperazina-N'-[2-etanosulfonico])
HMGC _o A redutase	Hidroxi-metil-glutaril-coenzima A redutase
IA	Índice aterogênico
ICI118551	Hidrocloreto de (±)-1-[2,3-(dihidro-7-metil-1H-inden-4-il)oxi]-3-[(1-metil)amino]-2-butanol
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
JH	Ratos jovens hiperlipidêmicos
JHA	Ratos jovens hiperlipidêmicos que ingeriram água
JHI	Ratos jovens hiperlipidêmicos que ingeriram infuso
JN	Ratos jovens normolipidêmicos
JNA	Ratos jovens normolipidêmicos que ingeriram água
JNA-5	Ratos jovens normolipidêmicos que ingeriram água e são controles dos que ingeriram infuso a 5%
JNA-10	Ratos jovens normolipidêmicos que ingeriram água e são controles dos que ingeriram infuso a 10%
JNI-5	Jovens normolipidêmicos que ingeriram infuso a 5%
JNI-10	Jovens normolipidêmicos que ingeriram infuso a 10%

Kcal	Quilocaloria
Kda	Quilodalton
KRBA	Krebs Ringer Bicarbonato adicionado de albumina
LCAT	Lecitina-colesterol acil transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LRSP	Receptor estimulado pela lipólise
MET	Metoprolol
NAD ⁺	Nicotinamida dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida dinucleotídeo reduzida
PA	Panículo adiposo
pD ₂	Logaritmo negativo da concentração do agonista que induz 50% da resposta lipolítica máxima
PROP	Propranolol
QM	Quilomícrom
RIA	Radioimunoensaio
RM	Resposta máxima
SR-AI	Receptor de varredura dos macrófagos classe A tipo I
SR-AII	Receptor de varredura dos macrófagos classe B tipo II
TAG	Triacilglicerol
<i>t</i> -CTN	<i>trans</i> -Crotonina
<i>t</i> -DHC/DHC	<i>trans</i> -Desidrocrotonina
U	Unidades
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

Lista de Tabelas

Tabela 3.1. Média ($\pm$ EPM) da concentração de colesterol total (mg/dl) em plasma de ratos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos analisados com <i>kits</i> da Laborlab e Roche.	19
Tabela 3.2. Média ($\pm$ EPM) da concentração de triacilgliceróis (mg/dl) em plasma de ratos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos analisados com <i>kits</i> da Laborlab e Roche.	21
Tabela 1. Média de peso corporal (g) de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA-5 e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.	29
Tabela 2. Média ($\pm$ EPM) do consumo diário de ração (g/rato) e de líquido (ml/rato) por ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso 5% (ANA e ANI-5, respectivamente) no início ("dia zero") e no final (14º dia) dos experimentos. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.	30
Tabela 3. Concentrações plasmáticas (mg/dl) de colesterol total, de triacilgliceróis (TAG) e de glicose obtidas em ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.	31
Tabela 4. Médias do peso corporal (g), pâncreo adiposo epididimal (g) e sua porcentagem (%) em relação ao peso corporal dos ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA-5 e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.	32
Tabela 5. Sensibilidade (pD ₂) e resposta lipolítica máxima (RM) para à isoprenalina, noradrenalina, adrenalina e BRL37344 na ausência ou na presença de antagonistas de adrenoreceptores β_1 ou β_2 em adipócitos epididimais isolados de ratos adultos do grupo normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.	34

Tabela 6. Médias de peso corporal (g) entre os ratos jovens que consumiram ração com 4% (JN) ou 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, os ratos dos grupos JN1-5, JN1-10 e JH1-10 receberam infuso a 5 ou a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth durante 15 dias em substituição a água de beber. Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA-5, JNA-10 e JHA-10. 41

Tabela 7. Médias diárias de consumo alimentar (g), ingesta calórica (Kcal) e ingesta líquida (ml) de ratos jovens que receberam dieta com 4% (JN) ou com 15% de lipídio (JH) durante 6 semanas. Nas últimas duas semanas, os ratos dos grupos JN1-5, JN1-10 e H1-10 receberam infuso a 5 ou a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth em substituição à água de beber. Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA-5, JNA-10 e JHA-10. 43

Tabela 8. Média ($\pm$ EPM) de consumo diário de ração balanceada (g) moída e peletizada durante 6 semanas, entre ratos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 10% (JNA e JN1-10, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias. 44

Tabela 9. Concentrações séricas (mg/dl) de colesterol total, HDL-Co, LDL-Co, VLDL-Co, triacilgliceróis e índice aterogênico de ratos jovens que consumiram dieta com 4% (JN) ou 15% de lipídio (JH) durante 6 semanas. Nas duas últimas semanas, os ratos dos grupos JN1-10 e JH1-10 receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber. Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA. 47

Tabela 10. Concentrações séricas de glicose (mg/dl), de insulina (ng/ml) e de leptina (ng/ml) dos ratos jovens que ingeriram ração com 4% (JN) ou com 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JN1-10 e JH1-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA. 49

Tabela 11. Médias do peso corporal (g), panículo adiposo epididimal (PA; g) e sua porcentagem (%) em relação ao peso corporal dos ratos jovens que ingeriram ração com 4% (JN) ou com 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 5 ou a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-5, JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA-5, JNA-10 e JHA-10. 51

Tabela 12. Médias do peso corporal (g) e do panículo adiposo (PA) da região peri-renal e mesentérica (g), bem como as porcentagens (%) em relação ao peso corporal, dos ratos jovens que consumiram ração com 4% (JN) ou com 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA. 52

Tabela 13. Médias do peso corporal (g) e do fígado (g) e a porcentagem (%) em relação ao peso corporal dos ratos jovens que consumiram ração contendo 4% (JN) ou 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA. 54

Tabela 14. Médias do peso corporal (g), das adrenais direita (D) e esquerda (E) (mg) e a porcentagem em relação ao peso corporal dos ratos jovens que consumiram ração contendo 4% (JN) ou contendo 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA. 55

Tabela 15. Liberação basal de glicerol de adipócitos epididimais isolados dos 57

ratos jovens que consumiram ração contendo 4% (JN) ou contendo 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 5 ou a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-5, JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA-5, JNA-10 e JHA-10.

Tabela 16. Sensibilidade (pD_2) e resposta lipolítica máxima (RM) para a isoprenalina, noradrenalina e CGP12177A na ausência ou na presença de antagonistas de adrenoreceptores β , seletivos ou não, em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (JNA e JNI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias. 59

Tabela 17. Sensibilidade (pD_2) e resposta lipolítica máxima (RM) para o BRL37344 na ausência ou na presença de propranolol ou metoprolol em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos tratados (JNI-5) ou não (JNA) com infuso a 5%. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias. 60

Tabela 18. Sensibilidade (pD_2) e resposta lipolítica máxima (RM) à isoprenalina, noradrenalina e adrenalina, obtidas de adipócitos epididimais isolados de ratos jovens que consumiram ração com 4% (JN) ou 15% de lipídios (JH) por seis semanas. Nas últimas duas semanas, ratos normo e hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA. 66

Tabela 19. Sensibilidade (pD_2) e resposta lipolítica máxima (RM) ao salbutamol, CGP12177A e BRL37344, obtidas em adipócitos epididimais isolados dos ratos jovens que ingeriram ração contendo 4% (JN) ou 15% de lipídios (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA. 71

Lista de Figuras

- Figura 1.** Curvas dose-resposta à isoprenalina na ausência ou na presença dos antagonistas ICI118551 (50 nM; ICI) ou metoprolol (1 μ M; MET) em adipócitos epididimais isolados de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber. 35
- Figura 2.** Curvas dose-resposta à adrenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber. 36
- Figura 3.** Curvas dose-resposta à noradrenalina na ausência ou presença dos antagonistas ICI118551 (50 nM, ICI) ou metoprolol (1 μ M, MET) em adipócitos epididimais isolados de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber. 37
- Figura 4.** Curvas dose-resposta ao BRL37344 em adipócitos epididimais isolados de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber. 38
- Figura 5.** Curvas dose-resposta à isoprenalina na ausência e na presença do antagonista ICI118551 (50 nM, ICI) em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens tratados (JNI-5) ou não (JNA) com infuso a 5% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber. 61
- Figura 6.** Curvas dose-resposta à noradrenalina na ausência e na presença dos antagonistas ICI118551 (50nM, ICI) ou metoprolol (1 μ M, MET) em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens tratados (JNI-5) ou não (JNA) com infuso a 5% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber. 62
- Figura 7.** Curvas dose-resposta ao CGP12117A em adipócitos epididimais 63

isolados de ratos jovens tratados (JNI-5) ou não (JNA) com infuso 5% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.

Figura 8. Curvas dose-resposta ao BRL37344 na ausência e na presença dos antagonistas de β -adrenoceptores metoprolol (1 μ M, MET) ou propranolol (0,01; 0,1; 1 μ M; PROP) em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens tratados (JNI-5) ou não (JNA) com infuso a 5% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.

64

Figura 9. Curvas dose-resposta à isoprenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.

67

Figura 10. Curvas dose-resposta à noradrenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.

68

Figura 11. Curvas dose-resposta a adrenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.

69

Figura 12. Curvas dose-resposta ao BRL37344 obtidas em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.

72

Figura 13. Curvas dose-resposta ao CGP12177A obtidas em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos tratados (JNI-10) ou

73

não (JNA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.

Figura 14. Curvas dose-resposta ao salbutamol em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber. 74

Figura 15. Inibição da lipólise induzida pela insulina em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos (JNA) e hiperlipidêmicos (JHA). 75

Figura 16. Fotomicrografia de hepatócitos de ratos que ingeriram dieta padrão (A e C) ou dieta contendo 15 % de lipídios (B e D) durante seis semanas. Em A e B foram usadas hematoxilina e eosina enquanto em C e D foi usado Sudan Black B. 77

Substância	Lista de Materiais Procedência
Álcool etílico	Allkimia Produtos para Laboratório (São Paulo, BR)
L-Ácido ascórbico	Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A.,BR)
Ácido sulfúrico	Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A.,BR)
ATP	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Bicarbonato de sódio	Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A.,BR)
BRL 37344	Tocris Cookson (St. Louis, MO, USA)
dibutiril-AMPC	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Colagenase tipo II	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Eosina	Merck SA (Rio de Janeiro, BR)
(±)-Epinefrina	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Formaldeído	ECIBRA (Merse, São Paulo, BR)
CaCl ₂	Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A., BR)
Cloreto de cádmio	Baker produtos químicos (São Paulo-BR)
Fosfato	MERSE (São Paulo, BR)
Fosfato biácido de potássio	Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A., BR)
Glicerófosfato desidrogenase tipo I	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Glicerol 99%	Merck S.A. (Rio de Janeiro, BR).
Gliceroquinase	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Glicocole	Merck S.A. (Rio de Janeiro, BR).
Glicose	Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A.,BR)
Hematoxilina	Merck S.A. (Rio de Janeiro, BR).
HEPES	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Heptano	Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A., BR)
Hidrazina hidratada 25%	Merck S.A. (Rio de Janeiro, BR).
Hipnol (Pentobarbital sódico)	Fontover – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, BR)
Historesina	LEICA® Microsystems (Nussloch, Heidelberger, Alemanha)
ICI 118,551	Tocris Cookson (St. Louis, MO, USA)
Insulina	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO,

Isopropanol	USA) Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A.,BR)
(-/+)-Isoproterenol	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Liquemine (Heparina)	Roche (São Paulo, BR)
Metoprolol	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
NAD	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
(-/+)-Norepinefrina	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Propranolol	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Soroalbumina bovina (Fração V)	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Sudan Black B,	Merck SA (Rio de Janeiro, BR)
Sulfato de magnésio	Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A. BR)
Xilol	Allkimia Produtos para Laboratório (São Paulo, BR)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Classificação dos lípides

Os lípides são componentes essenciais da dieta que formam um grupo heterogêneo de compostos relacionados direta ou indiretamente com ácidos graxos. Estes compostos possuem a propriedade de ser relativamente insolúveis em água e solúveis em solventes apolares. Os seguintes lípides são importantes para o ser humano: ácidos graxos, triacilgliceróis e fosfolípides. O colesterol, considerado geralmente um lipídeo, é um álcool monoídrico não saturado da classe dos esteróides (MAHLEY *et al.*, 1998). É formado pelo esterol e não possui ácidos graxos na sua composição mas, por apresentar algumas das características físicas e químicas das gorduras, por ser derivado de gorduras e ser metabolizado de forma semelhante, é considerado, do ponto de vista dietético, como gordura. Assim sendo, os triacilgliceróis, os fosfolípidos e o colesterol, constituem os lipídios mais comuns no nosso organismo (PRIZKOVÁ, 1973).

Os ácidos graxos são constituídos por cadeias de carbono hidrocarboxiladas, podendo se apresentar como saturados e insaturados. São exemplos de ácidos graxos saturados, os ácidos láurico, palmítico, mirístico e esteárico e, de ácidos graxos insaturados, os ácidos oléico, linoléico e os do grupo ômega-3. Os ácidos graxos têm função energética e participam fundamentalmente da síntese de lipoproteínas e de prostaglandinas (MAHLEY *et al.*, 1998).

Os triacilgliceróis são formados pela esterificação do glicerol por três moléculas de ácidos graxos. Têm também papéis energéticos, sendo utilizados de imediato ou armazenados, principalmente nos tecidos adiposo e hepático, para posterior utilização (MAHLEY *et al.*, 1998).

Os fosfolípides são compostos complexos, formados por glicerol, ácidos graxos, base nitrogenada e fósforo (MAHLEY *et al.*, 1998).

O colesterol pode se apresentar sob a forma livre ou esterificada (ésteres de colesterol), não sendo encontrado nos vegetais. Juntamente com os fosfolípides, possui função estrutural, formando a dupla camada que constitui as membranas celulares e a

camada única que reveste as lipoproteínas. O colesterol desempenha ainda outros importantes papéis no organismo, sendo precursor de ácidos biliares, hormônios esteróides e vitamina D (MAHLEY *et al.*, 1998).

As fontes de lípidos no organismo podem ter origem endógena, ou seja, através de síntese interna, e origem exógena, isto é, através da alimentação (MAHLEY *et al.*, 1998).

1.2. Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas

Devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso, os lípidos são transportados no plasma sob a forma de lipoproteínas. Estas partículas são macroagregados constituídos por lípidos apolares, triacilgliceróis e ésteres de colesterol, circundados por uma monocamada hidrofílica de colesterol livre, fosfolípidos e apolipoproteínas. Estas últimas, além da função estrutural, são responsáveis pela interação das lipoproteínas com os receptores celulares em diferentes sítios de metabolização e pela ativação de enzimas envolvidas no seu metabolismo. Temos como exemplo, apo A-I e A-II, que são cofatores positivo e negativo, respectivamente, para a lecitina: colesterol acil transferase (LCAT) (BROWN & GOLDSTEIN, 1986; BREWER *et al.*, 1988; MAHLEY *et al.*, 1998). As lipoproteínas podem ser definidas como as unidades funcionais de transporte de lipídios no plasma e têm a função de suprir os tecidos com lipídios, provenientes da dieta ou sintetizados pelo próprio organismo.

As lipoproteínas diferenciam-se pela proporção dos constituintes da fração lipídica e pelos tipos de apolipoproteínas, o que lhes confere densidade e padrão eletroforético distintos que permitem a sua classificação em: quilomícrons [densidade (d) < 0,95 g/ml], lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL, d < 1,006 g/ml), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL, d = 1,006 a 1,019 g/ml), lipoproteínas de densidade baixa (LDL, d = 1,019 a 1,063 g/ml) e lipoproteínas de alta densidade (HDL, d = 1,063 a 1,21 g/ml) (HAVEL & KANE, 1975; QUINTÃO, 1995; MAHLEY *et al.*, 1998; ORDOVAS & SCHAEFER, 1999).

Os quilomícrons são partículas esféricas com 750 a 6000 Å de diâmetro, constituídas principalmente por triacilgliceróis provenientes da dieta e caracterizados pela presença da apolipoproteína B-48. Os quilomícrons são sintetizados nos enterócitos, secretados para o espaço intersticial e conduzidos pela linfa à circulação sanguínea através do ducto torácico. Ao atingirem os capilares periféricos, sofrem hidrólise pela enzima lipoproteína lipase. Deste modo, os quilomícrons transformam-se em remanescentes e são rapidamente removidos do plasma com meia-vida de minutos (MORTIMER *et al.*, 1995), após interagirem com receptores hepáticos específicos: o receptor de LDL (LDLr) ou B-E e a proteína relacionada ao receptor de LDL, bem como os receptores de VLDL e o receptor estimulado por lipólise (GOTTO *et al.*, 1986; BIHAIN *et al.*, 1995).

A lipoproteína lipase possui apolipoproteína CII como cofator positivo. É sintetizada principalmente nos tecidos adiposo e muscular, atravessa a célula endotelial da parede dos vasos sanguíneos e se ancora na superfície da membrana plasmática destas células, ficando em contato com a luz do vaso. Ao hidrolisar os triacilgliceróis das lipoproteínas, a lipoproteína lipase libera glicerol e ácidos graxos livres que, por sua vez, ligam-se à albumina e são transportados aos diversos tecidos, que os utilizam como substratos energéticos ou para a ressíntese de triacilgliceróis. Sob ação da lipoproteína lipase, os quilomícrons vão progressivamente perdendo triacilgliceróis do interior da partícula, além de componentes de superfície tais como fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteínas (A-I, A-II, C-II, C-III, E), que se desprendem da partícula como estruturas lamelares, dando origem as HDL imaturas.

Os receptores de LDL são proteínas que possuem 839 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 120 KDa. Estão expressos nas superfícies de inúmeras células, principalmente hepatócitos (MAHLEY *et al.*, 1998) e contém cinco domínios. O sítio de ligação com as lipoproteínas é constituído por 292 aminoácidos na porção amino-terminal. Esta região é rica em cisteína e contém glutamina e ácido aspártico, mediadores críticos para a ligação das apolipoproteínas B e E (MAHLEY *et al.*, 1999). A função do receptor de LDL é de captar lipoproteínas que contenham apolipoproteínas B e E, incluindo LDL, remanescentes de quilomícrons, VLDL, remanescentes de VLDL, IDL, LDL e HDL que possuem apolipoproteína E (MAHLEY *et al.*, 1999).

O receptor de VLDL humano foi descrito como um novo membro da superfamília de receptores de LDL, que se liga especificamente a VLDL, via apolipoproteína E e lipoproteína lipase. Tanto a apolipoproteína E como a lipoproteína lipase estão presentes nos remanescentes de quilomícrons e, portanto, são descritos como ligantes fisiológicos do receptor de VLDL (NIEMEIER *et al.*, 1996).

As VLDL, à semelhança dos quilomícrons, são partículas de grande diâmetro (300 a 700 Å), ricas em triacilgliceróis, porém, diferem dos quilomícrons por serem sintetizadas no fígado e possuírem como principal constituinte protéico a apoB₁₀₀. No plasma, as VLDL são metabolizadas pela mesma via dos quilomícrons, ou seja, nos capilares onde seu conteúdo em triacilgliceróis é hidrolisado pela enzima lipoproteína lipase, transformando-as progressivamente em remanescentes de VLDL e, finalmente, em IDL (GOLDBERG *et al.*, 1996).

As IDL e os remanescentes de VLDL podem ser diretamente removidos da circulação no fígado pelos receptores B-E, receptores estimulados pela lipólise (LRP e LSP) e receptor de VLDL (HAVEL, 1984; NIEMEIER, 1996). As IDL podem ser transformadas em LDL após a hidrólise quase completa dos triacilgliceróis pela lipase hepática. Aproximadamente 50% destas partículas são convertidas em LDL (HAVEL, 1984).

As LDL são partículas de pequeno diâmetro (150 a 300 Å), pobres em triacilgliceróis, constituídas por uma molécula de apolipoproteína B₁₀₀, e um núcleo composto essencialmente por éster de colesterol (HAVEL *et al.*, 1984). Possuem meia-vida plasmática de 2 a 5 dias, transportam a maior parte do colesterol plasmático e são preferencialmente captadas pelos receptores B-E expressos por células em processo ativo de divisão ou por tecidos que utilizam o colesterol como matéria-prima na síntese de hormônios, tais como o córtex das glândulas supra-renais e gônadas, ou de sais biliares através do fígado (BROWN *et al.*, 1981; BROWN *et al.*, 1990; GOLDSTEIN & BROWN, 1990; MAHLEY *et al.*, 1998).

A homeostase do colesterol ocorre em função de sua concentração intracelular (MAHLEY *et al.*, 1998). Quando esta aumenta ocorre inibição da transcrição do gene do receptor de LDL, inibição da expressão de hidróxi-metil-glutaril co-enzima A (HMG-CoA) redutase e aumento da esterificação do colesterol, no citoplasma.

Pelo seu pequeno tamanho, as LDL, quando em alta concentração plasmática, atravessam facilmente a barreira endotelial e infiltram-se para o espaço sub-endotelial da parede vascular (HAVEL, 1984), ligando-se a proteoglicanos e fibras de colágeno. Neste local tornam-se mais susceptíveis às modificações químicas de seus componentes, tais como oxidação e glico-oxidação (FU *et al.*, 1996).

As LDL modificadas estimulam células endoteliais a liberar fatores quimiotáticos positivos para células linfomonocitárias, que migram para este local transformando-se em macrófagos. Após essas modificações, as LDL passam a ser reconhecidas e fagocitadas pelos receptores de varredura dos macrófagos, SR-AI e SR-AII, que não são regulados pelo aumento de colesterol intracelular. O acúmulo progressivo do colesterol intracelular leva à transformação dessas células em células espumosas, dando início à formação da lesão ateromatosa (MAHLEY *et al.*, 1998; ORDOVAS & SCHAEFER, 1999).

As HDL têm como componentes estruturais as apolipoproteínas A-I e A-II (ROHEIM & ASZTALOS, 1995), formadas no fígado e no intestino (FORTE *et al.*, 1993; ORDOVAS & SCHAEFER, 1999), originam-se pela ação da lipoproteína lipase sobre os quilomícrons e as VLDL (WINDLER *et al.*, 1980).

As HDL nascentes são partículas discoidais de pequeno diâmetro (50 a 60 Å), formadas principalmente por apolipoproteínas A-I, colesterol livre e fosfolípidos. Encontradas, preferencialmente, na linfa e no interstício da parede dos vasos, migram eletroforéticamente na fração pré- β (FIELDING & FIELDING, 1995). A HDL pode ser sub-fracionada em pré- β 1, pré- β 2 e pré- β 3 (HAVEL & KANE, 1955). Na circulação, 85% das HDL tem migração α (da migração eletroforética) e correspondem a HDL₂, HDL_{3a} e HDL_{3b}.

1.3. Dislipidemias e seu tratamento

O aumento ou a diminuição na concentração de lipídios caracteriza as hiperlipidemias ou hipolipidemias, respectivamente. Estas levam a alterações patológicas conhecidas como hiperlipoproteinemias e hipolipoproteinemias, respectivamente. Destas duas classes de patologias, a de maior interesse clínico é a

das hiperlipoproteinemias ou hiperlipidemias, freqüentemente associadas ao aumento do risco de instalação de outras patologias, tais como as doenças isquêmicas, pancreatite, esteatose hepática, etc.

Hiperlipidemia é o quadro clínico no qual as concentrações plasmáticas de colesterol e de triacilgliceróis estão maiores do que aquelas consideradas normais, e pode ter origem primária, ou seja, ocorrer como resultado de predisposição genética, ou ser de origem secundária, desenvolvida a partir de condições médicas, de influências ambientais, ou ainda como consequência da combinação de fatores genéticos e ambientais (GINSBERG, 1990; HAVEL & KANE, 1995). Portanto, na dislipidemia secundária, o consumo de dieta contendo quantidade de gordura (principalmente saturada) acima do recomendado, pode alterar a composição dos lipídios do soro sanguíneo e do fígado e favorecer o desenvolvimento de hiperlipidemias, caracterizadas principalmente pela elevação das concentrações séricas de colesterol e suas frações, bem como de triacilgliceróis levando a uma série de alterações metabólicas que podem resultar na instalação da síndrome plurimetabólica (síndrome X), aumentando, portanto, a morbi-mortalidade (BROWN & GOLDSTEIN, 1993).

Segundo Lee (1994), uma das manifestações de alterações metabólicas é o acúmulo intracelular de várias substâncias em quantidades anormais, as quais podem se acumular transitória ou permanentemente nas células, sendo que de maneira geral são extremamente tóxicas para a célula e o organismo como um todo. Estas podem estar localizadas no citoplasma (normalmente nos lisossomos) ou no núcleo, sendo que em certas situações a célula pode produzir a substância anormal, e em outras, a substância pode ser resultado de processos patológicos ocorridos em outra parte do corpo. Uma grande variedade de lipídios pode se acumular nas células de vários órgãos, tais como, fígado, rins e coração. Dentre esses lipídios, podemos citar os triacilgliceróis, que são os mais abundantes, além do colesterol/colesterol éster e dos fosfolipídios (LEE, 1994).

O termo esteatose ou alteração de gordura é definido pelo acúmulo anormal de triacilgliceróis dentro do parênquima celular. A alteração de gordura é observada mais freqüentemente no fígado, já que este é o principal órgão envolvido no metabolismo de gordura, apesar de poder ocorrer em outros órgãos, como descrito

acima, tais como, o coração, os músculos e os rins. O conteúdo de lipídios nos hepatócitos é regulado pelas atividades integradas de enzimas celulares que catalisam a captação de lipídios, sua síntese, oxidação e sua exteriorização da célula. Quando a quantidade de gordura que entra nos hepatócitos excede a capacidade para a sua oxidação ou exteriorização, então a esteatose hepática se instala (KOTEISH & DIEHL, 2001). Diferentes mecanismos propiciam o acúmulo de triacilgliceróis no fígado. Ácidos graxos livres vindos do tecido adiposo ou da alimentação são esterificados para triacilgliceróis, convertidos em colesterol ou fosfolipídios, ou oxidados para corpos cetônicos. Uma dieta com alto teor de gordura pode, então, favorecer a instalação de esteatose hepática. Outra situação que propicia o acúmulo de lipídios nos hepatócitos, e desencadeia disfunção deste órgão, ocorre pela elevação da lipogênese, devido, por exemplo, ao excessivo consumo de carboidratos. Concorre também para esta situação o aumento da taxa de mobilização dos lipídios do tecido adiposo para o fígado, como ocorre no diabetes mellitus, jejum, e hipoglicemia ou por influência de fatores hormonais. As causas da esteatose incluem toxinas, baixa ingesta proteica, diabetes mellitus, obesidade e anóxia celular (LEE, 1994; KOTEISH & DIEHL, 2001).

A esteatose ou doença da gordura no fígado é uma condição clínica-patológica que inclui um amplo espectro de danos hepáticos. A doença pode partir de uma simples esteatose, evoluir para hepatite-esteatótica e avançar para fibrose chegando até a cirrose hepática (ALBA & LINDOR, 2003).

Pacientes com esteatose apresentam quadro característico da síndrome de resistência à insulina, isto é, valores altos do índice de massa corporal, elevadas concentrações séricas de triacilgliceróis e baixas concentrações séricas da fração HDL de colesterol. Além disso, nos pacientes hipercolesterolêmicos e com esteatose hepática elevações séricas de triacilgliceróis se devem a aumentadas concentrações deste lipídio na fração VLDL de colesterol (TACIKOWSKI *et al.*, 2002).

De acordo com as conseqüências que as dislipidemias podem acarretar, não há dúvidas que a terapia hipolipidêmica é altamente desejável por reduzir o risco para indivíduos com elevadas concentrações plasmáticas de colesterol e/ou triacilgliceróis (WITZTUM, 1996). A terapêutica deve ser iniciada com mudanças individualizadas no estilo de vida, que compreendem hábitos alimentares saudáveis, busca e manutenção

do peso ideal, exercício físico regular, combate ao tabagismo e promoção do equilíbrio emocional. Não sendo atingidos os objetivos propostos, deve ser considerada a introdução de drogas isoladas ou associadas, dependendo das necessidades, com manutenção da dietoterapia (BHATNAGAR, 1998).

Há uma década atrás, a escolha de uma droga que diminuísse as concentrações séricas de lipídios ficava restrita às resinas sequestrantes de ácido biliar, ácido nicotínico, gemfibrozil, bezafibrato e clofibrato. O uso de inibidores da HMG CoA redutase (ou compostos de estatina) foi o maior avanço na terapia hipolipidêmica em meados dos anos 80 (ENDO, 1992). Recentemente, drogas a base de fibrato estão disponíveis e, em alguns países, existe a possibilidade de escolher entre seis inibidores da HMG CoA redutase (BHATNAGAR, 1998).

Com a possibilidade do uso de uma terapêutica mais natural e com menores efeitos colaterais, muitas plantas tradicionais têm sido usadas para o controle de problemas causados pela hiperglicemia e hiperlipidemia (BAILEY & DAY, 1989; CHOI *et al.*, 1991; MARLES & FARNSWORTH, 1995; YOSHIKAWA *et al.*, 1998; WANG & NG, 1999; SILVA *et al.*, 2001a e b), entre as quais se encontra a *Croton cajucara* Benth.

1.4. Croton cajucara Benth.

Na região norte do Brasil, mais especificamente em Belém do Pará, é difundida a utilização de uma planta da família Euphorbiaceae, a *Croton cajucara* Benth., conhecida como “sacaca”, para o tratamento de problemas gástricos, hepáticos, de diabetes, de hipertensão arterial, de colesterol elevado e como coadjuvante nos regimes de emagrecimento (SIMÕES *et al.*, 1979; ITOKAWA *et al.*, 1989; KUBO *et al.*, 1991). Vários clerodane diterpenos foram isolados a partir desta planta, incluindo trans-desidrocrotonina (*t*-DHC), trans-crotonina (*t*-CTN), cis-cajucarina B, cajucarina A e sacacarina (MACIEL *et al.*, 1998a).

Estudos fitoquímicos das cascas de plantas do gênero *Croton*, isolaram mais de 800 compostos com atividade biológica presentes nesta planta, entre os quais alguns apresentaram efeitos anti-tumoral e antibiótico (MCCHESNEY & CLARK, 1991; SIDDIQUI *et al.*, 1992; HAGIWARA *et al.*, 1995; MACIEL *et al.*, 2000), antiinflamatório

(ICHIHARA *et al.*, 1992; CARVALHO *et al.*, 1996; PERAZZO *et al.*, 1997), hipoglicêmico (FARIAS *et al.*, 1997) ou anti-ulcerativo (BRITO *et al.*, 1998; HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002). A atividade farmacológica da *trans*-desidrocrotonina, principal componente ativo desta planta, tem sido extensivamente estudada, mostrando que esta possui efeitos anti-inflamatório e analgésico, anti-ulcerativo, anti-estrogênico, hipoglicêmico e hipolipidêmico (CARVALHO *et al.*, 1996; FARIAS, *et al.*, 1997; BIGHETTI *et al.*, 1999; MACIEL *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001; CAMPOS *et al.*, 2002).

Tanto as cascas como as folhas desta planta são, popularmente, usadas na forma de chá ou cápsulas para o tratamento de várias patologias. O chá pode se apresentar em várias concentrações de acordo com o modo de preparo (MACIEL *et al.*, 1998b). A forma de ingestão pode variar de acordo com a preferência de cada pessoa que irá consumi-la.

Medicamentos comerciais contendo plantas medicinais, incluindo *Croton cajucara*, são comuns em Belém. Entretanto, em muitos casos esta planta é usada sem nenhuma recomendação ou controle médico, uma vez que a medicina popular faz parte da cultura da Amazônia. Van Den Berg (1982) relacionou aproximadamente 1200 diferentes plantas medicinais na Amazônia, usadas para programas de emagrecimento ou tratamento de alguma doença. Nesta lista, *Croton cajucara* é um exemplo típico da forte crença cultural desta região do Brasil. Em outras regiões do Brasil, o uso de extratos obtidos de plantas medicinais no tratamento de doenças também é uma prática comum que vem aumentando muito nos últimos anos. Estes são usados sem conhecimento exato dos efeitos que exercem sobre a saúde.

Dados químicos sobre *Croton cajucara* e seu uso na medicina tradicional foram obtidos por Araújo *et al.* (1971), Simões *et al.* (1979), Van Den Berg (1982), Müller *et al.* (1986), Di Stasi *et al.* (1989), Martins (1989) e Maciel *et al.* (2000). Informações etnofarmacológicas indicam que as folhas e as cascas de *Croton cajucara* são usadas para cuidados primários de saúde (DI STASI *et al.*, 1989; MARTINS, 1989; VAN DEN BERG, 1993; DI STASI *et al.*, 1994), e que seu uso prolongado foi correlacionado com hepatotoxicidade (MACIEL, 1997; MACIEL *et al.*, 1998b). Além disso, plantas do gênero *Croton* são conhecidas pelos efeitos irritantes e oncogênicos, atribuídos principalmente à presença de ésteres diterpenos de forbol. No caso da

Croton cajucara esses efeitos ainda não foram confirmados (FARIAS *et al.*, 1996; GRYNBERG *et al.*, 1999).

O infuso obtido das cascas de *Croton cajucara*, oferecido por via oral a coelhos geneticamente hipercolesterolêmicos, causou redução das concentrações plasmáticas de colesterol total e de triacilgliceróis (OLIVEIRA *et al.*, 1995). Em ratos onde a hipercolesterolemia foi induzida pela ingestão de emulsão oleosa, administrada através de gavagem, o extrato hidroalcoólico de folhas de sacaca (200 mg/Kg, via oral), reduziu as concentrações séricas de colesterol total e de LDL (FARIAS *et al.*, 1996).

Os resultados conflitantes, relatados acima sobre os efeitos benéficos ou maléficos da *Croton cajucara* Benth poderiam ser justificados por variações em suas propriedades causadas pelas alterações nos cuidados com o solo, o modo de colheita (clima e idade da planta), a manipulação e o acondicionamento da mesma, que são primordiais para manter a integridade da planta e, conseqüentemente, dos seus efeitos, principalmente na Amazônia, onde o clima é quente e úmido, propenso à proliferação de microorganismos.

1.5. A célula adiposa

Os lipídios são armazenados, principalmente, no fígado e no tecido adiposo. O tecido adiposo branco é considerado o principal órgão de estoque de energia do corpo, na forma de triacilgliceróis que, juntamente com os glicídios, constituem a principal fonte de energia para os diferentes processos metabólicos. O tecido adiposo marrom possui como principal função a termogênese, a qual garante a manutenção da temperatura corpórea, embora também contribua para a dissipação de energia. A célula adiposa constitui a unidade funcional dos tecidos adiposos branco e marrom. Assim, a investigação dos mecanismos que controlam o estoque, a mobilização e a utilização dos lipídios, bem como outras funções do tecido adiposo, é realizada através de estudos com células adiposas isoladas (ROMSOS & LEVEILLE, 1974).

A mobilização dos lipídios armazenados no tecido adiposo é iniciada pela ação de agentes lipolíticos secretados sempre que ocorre demanda por substratos energéticos (ROMSOS & LEVEILLE, 1974). A adrenalina (secretada pela adrenal) e a

noradrenalina (liberada pelas terminações nervosas simpáticas que inervam o tecido adiposo), constituem os principais agentes lipolíticos endógenos (STEINBERG, 1972). Por outro lado, a insulina atua nos adipócitos brancos tanto como agente anti-lipolítico como lipogênico (ÖSTMAN, 1990). A ação das catecolaminas é mediada por quatro subtipos de adrenoreceptores (β_1 , β_2 , β_3 , e α_2) (HOLLENGA & ZAAGSMA, 1989; LANGIN *et al.*, 1991; CARPÉNÉ *et al.*, 1994; BOUSQUET-MÉLOU *et al.*, 1995; LAFONTAN & BERLAN, 1995; LAFONTAN *et al.*, 1997) envolvidos na regulação das funções das células adiposas e na lipólise. Apesar da natureza glicoprotéica comum e de atuarem através do mesmo sistema de segundo mensageiro, que gera o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), os três adrenoreceptores do subtipo β , apresentam especificidades estruturais e funcionais (BOWEN *et al.*, 1992) relacionadas com o tipo de tecido onde aparecem e com o estado funcional orgânico (TAOUIS *et al.*, 1987; idem 1989; MAURIÉGE *et al.*, 1987; ARNER *et al.*, 1990a e b; idem 1992). Além disso, a importância funcional de cada subtipo desses receptores varia de acordo com a espécie, o sexo e a idade do animal, bem como a natureza do depósito de gordura (LAFONTAN & BERLAN, 1995).

O aumento na concentração intracelular de AMPc, resultante da ativação dos adrenoreceptores β , estimula a lipase hormônio sensível, que catalisa a hidrólise dos triacilgliceróis a ácidos graxos e glicerol (LAFONTAN & BERLAN, 1995; LANGIN *et al.*, 1996; LAFONTAN *et al.*, 1997). Nos tecidos, o glicerol pode ser convertido a glicerol-3-fosfato pela ação da gliceroquinase e, então ser oxidado em dihidroxiacetona fosfato pela ação de uma glicerofosfato desidrogenase, tendo a nicotinamida dinucleotídeo (NAD^+) como cofator. A dihidroxiacetona fosfato produzida entra na via glicolítica como substrato para a triose fosfato isomerase (GARRETT & GRISHAM, 1995).

O efeito inibitório da insulina é resultado da diminuição na concentração de AMPc decorrente de estimulação da fosfodiesterase e da possível inibição da adenilato ciclase, diminuindo a atividade da fosfoquinase dependente de AMPc (BÜLOW, 1993). Outro agente com efeito anti-lipolítico que podemos citar é a adenosina, que ativa receptores específicos acoplados à proteína G inibitória (G_i), diminuindo assim a ação das catecolaminas mediadas pelos adrenoreceptores β (LONNQVIST & ARNER, 1989).

A sensibilidade da célula adiposa à ação lipolítica de agentes homólogos e heterólogos dos adrenoreceptores β pode variar em alguns estados fisiológicos, tais como o estresse, o estado alimentar e o exercício físico e, em estados patológicos, tais como o diabetes e a obesidade, situações essas em que ocorre alteração da concentração de catecolaminas circulantes, alterando a resposta da célula adiposa a essas substâncias (GUIDICELLI *et al.*, 1979; BALKIN & SONNENBERG, 1981; BENOVIC *et al.*, 1988; CARPENÉ *et al.*, 1990 a, b; FARIAS-SILVA *et al.*, 1999). Um exemplo disso é observado em estudos onde a infusão prolongada de noradrenalina acarretou dessensibilização dos adrenoreceptores β_1 e β_2 , mas não do subtipo β_3 (CARPENÉ *et al.*, 1993; LAFONTAN & BERLAN, 1993). Em adipócitos de ratos submetidos a estresse por choque nas patas, Farias-Silva *et al.* (1999) observaram dessensibilização da resposta para noradrenalina, agonista de adrenoreceptores β_1 e β_3 e ao BRL37344 (agonista de adrenoreceptores β_3), juntamente com sensibilização da resposta à adrenalina e à isoprenalina mediada por adrenoreceptores β_2 . E, mais recentemente, utilizando este mesmo modelo, Farias-Silva *et al.* (2003), demonstraram que ocorre diminuição na expressão de β_1 -AR, β_3 -AR e em GR (receptor de glicocorticóide) e aumento na expressão de β_2 -AR.

Investigações a respeito da variação de sensibilidade ou do recrutamento diferenciado dos adrenoreceptores, em diferentes situações, vêm fornecendo indícios que podem sustentar a hipótese de um tipo de sinalização adrenérgica celular (GRANNEMAN *et al.*, 1991; *idem* 1992a e b; ARNER *et al.*, 1992) de modo que diferentes estados funcionais poderiam determinar acoplamentos preferenciais de um ou outro subtipo com a proteína Gs (VALET, 1989; GALITZKY, 1990; *idem* 1993a e b). De fato, Lafontan & Berlan (1993), propuseram um modelo de sinalização adrenérgica envolvendo os adrenoreceptores α e β . Os adrenoreceptores α_2 , também presentes na célula adiposa, funcionariam como frenadores do efeito lipolítico provocado pela estimulação através dos subtipos β .

Portanto, a regulação da lipólise é complexa, e isto se deve à heterogeneidade nos depósitos regionais de gordura pelo corpo, destacando principalmente, os depósitos das regiões visceral e subcutânea, uma vez que este último corresponde a aproximadamente 80% de todo o tecido adiposo corporal

(ARNER, 1997), enquanto o tecido adiposo visceral está localizado ao redor do estômago e intestinos, de tal forma que suas secreções são drenadas para a veia porta e tem, portanto, acesso direto ao fígado. Nesta região, a mobilização de lipídios é intensa quando há necessidade de energia, tais como, exercício físico e lactação (ARNER, 1997). As catecolaminas são mais ativas na área visceral, seguida pelas áreas subcutânea abdominal e glúteo-femoral. Essas variações regionais se devem, pelo menos em parte, às diferenças nas populações de adrenoreceptores, assim como, ao suprimento sanguíneo (ARNER, 1997). Essa complexidade se deve também a diferença de sexo e diversidade de hormônios e outros fatores que governam este processo (LARGE & ARNER, 1998). A variação genética também contribui para sua heterogeneidade, destacando o polimorfismo do gene da lipase hormônio sensível, dos genes dos subtipos de adrenoreceptores β , e do gene do substrato 1 do receptor de insulina, que poderiam também estar interferindo na regulação da lipólise.

Estas variações regionais podem levar a alterações das propriedades fisiológicas da célula adiposa e/ou de sua sensibilidade a agentes lipolíticos ou anti-lipolíticos resultando em hiperlipidemia. Embora ainda não tenha sido demonstrada cientificamente, é bastante conhecida a relação entre estresse, uma condição em que ocorrem alterações de sensibilidade adrenérgica (BASSANI & DE MORAES, 1987; SPADARI & DE MORAES, 1988; SPADARI *et al.*, 1988; NOURANI *et al.*, 1992; RODRIGUES *et al.*, 1995; MARCONDES *et al.*, 1996; VANDERLEI *et al.*, 1996) e o processo de hiperlipidemia, o qual pode ser desencadeado por alterações do metabolismo de gordura (TASKINEN *et al.*, 1983; TSIGOS *et al.*, 1993).

São objetivos deste trabalho:

- 1- Estudar o efeito do infuso de *C. cajucara* Benth sobre os marcadores metabólicos em ratos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos;
- 2- Determinar a sensibilidade a agonistas β -adrenérgicos da resposta lipolítica de adipócitos isolados de ratos normo e hiperlipidêmicos tratados ou não com o infuso;
- 3- Avaliar o efeito da dieta e do infuso sobre a evolução ponderal e a morfologia hepática destes animais.

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do tratamento com infuso obtido das cascas de *Croton cajucara* Benth em ratos Wistar machos jovens e adultos normo- ou hipercolesterolêmicos.

Para tal pretendemos:

- 1- Estudar o efeito do infuso de *C. cajucara* Benth sobre os marcadores metabólicos em ratos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos;
- 2- Determinar a sensibilidade a agonistas β -adrenérgicos da resposta lipolítica de adipócitos isolados de ratos normo e hiperlipidêmicos tratados ou não com o infuso;
- 3- Avaliar o efeito da dieta e do infuso sobre a evolução ponderal e a morfologia hepática destes animais.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Animais

Utilizamos ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), jovens (6 semanas) e adultos (12 semanas) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e pela Anilab - Centro de Criação e Fornecimento de Ratos de Laboratório (Paulínia, SP). Os ratos foram mantidos por um período de 7 dias antes do início dos experimentos em gaiolas coletivas (3 a 4 animais por gaiola), acondicionadas em sala dotada de controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e do ciclo claro-escuro (12/12 horas), com o ciclo claro iniciando-se às 6:30 horas.

Durante os experimentos, os ratos foram cuidados em concordância com os princípios delineados por Olfert *et al.* (1993) para o uso de animais em pesquisa e educação. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), recebendo o número 058-1.

3.2. Grupos experimentais

3.2.1. Ratos normolipidêmicos (N):

Adultos (AN)

Após uma semana de adaptação ao biotério, os ratos adultos foram alojados em gaiolas metabólicas por um período de 15 dias e o consumo hídrico e alimentar foi diariamente mensurado. Neste período os animais receberam diariamente 100 g de dieta padrão balanceada para roedores, marca Purina, contendo 4% de gordura e 100 ml de líquido (água, ANA ou infuso a 5%, ANI-5).

Jovens (JN)

Ratos com 6 semanas de idade foram pesados, colocados em gaiolas coletivas (3 a 4 animais por gaiola) e continuaram a receber a dieta padrão até o final do protocolo experimental.

A partir da 10^a semana de idade esses animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, para o controle diário do consumo de ração e de líquido, e foram subdivididos em dois grupos, ou seja, animais normolipidêmicos água (JNA), os quais mantiveram a ingestão líquida de água, e animais normolipidêmicos infuso (JNI-5 ou JNI-10), para os quais a água de beber foi substituída pelo infuso das cascas de *C. cajucara* a 5 ou 10%. Todos os animais tiveram acesso livre a 100 g/dia de ração padrão e 100 ml/dia de água ou infuso.

3.2.2. Ratos hiperlipidêmicos (H):

Adultos (AH)

Após uma semana de adaptação ao biotério, os ratos adultos foram alojados em gaiolas coletivas e foi oferecido, durante 4 semanas, dieta com alto teor de lipídeos contendo 15% de gordura proveniente da manteiga de cacau, 1,25% de colesterol e 0,50% de ácido cólico, sob a marca Purina (ração # 5001) e fabricada por Dyets Inc. (Bethlehem, PA, USA). Os ratos tiveram acesso diariamente a 100 g de ração e 100 ml de água.

Jovens (JH)

Ratos com 6 semanas de idade foram pesados, colocados em gaiolas coletivas (3 a 4 animais por gaiola) e em seguida, passaram a receber a dieta com alto teor de lipídeos até o final do protocolo experimental.

A partir da 10^a semana de idade esses animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, para o controle diário do consumo de ração hiperlipidêmica e

de líquido, e foram subdivididos em dois grupos, ou seja, animais hiperlipidêmicos água (JHA), os quais mantiveram a ingesta líquida de água, e animais hiperlipidêmicos infuso (JHI), para os quais a água de beber foi substituída pelo infuso das cascas de *C. cajucara* a 10%. Todos os animais tiveram acesso livre a 100 g/dia de ração hiperlipidêmica e 100 ml/dia de água ou infuso.

3.3. Preparo do infuso a partir das cascas de Croton cajucara Benth

As cascas de *C. cajucara* foram coletadas de uma plantação experimental em Benfica, próxima a Belém do Pará, região norte do Brasil. Uma amostra foi identificada por Nelson A. Rosa e depositada no herbário do “Museu Paraense Emílio Goeldi” sob número 247. Após aquisição, os fragmentos de casca foram moídos na Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, e o pó obtido foi acondicionado a vácuo para armazenagem em temperatura ambiente.

O infuso das cascas de *C. cajucara* era preparado diariamente nas concentrações de 5 ou 10% misturando-se 5 ou 10 g, respectivamente, de pó das cascas de *C. cajucara* em 100 ml de água fervente. A mistura era tampada e deixada em infusão durante 20 minutos. Em seguida, escorriam-se as gotículas contidas na tampa de vidro para dentro da mistura, pois nestas gotículas encontram-se óleos essenciais, contendo os princípios ativos da planta. Processava-se então a filtração do infuso, fazendo-o passar através de filtro de papel. O infuso filtrado era oferecido aos ratos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos (100 ml por dia/animal) em substituição à água de beber, durante 15 dias (OLIVEIRA *et al.*, 1995).

3.4. Coleta de sangue

A coleta de sangue foi feita antes do início de qualquer tratamento, após duas semanas de tratamento com a dieta hiperlipídica e ao final do tratamento com o infuso.

Para os ratos adultos, após jejum de 16 horas, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (i.p., 60 mg/Kg) e após 45 minutos foi realizada

a coleta de cerca de 5 ml de sangue, através de punção cardíaca, com seringa descartável e agulha hipodérmica (30 x 8 mm) heparinizada. O plasma obtido foi congelado a -20°C , até que fossem realizadas as análises de colesterol total, triacilgliceróis e glicose.

Para os ratos jovens, os procedimentos para a retirada de amostra foram os mesmos, porém, não foi utilizado anticoagulante. O sangue obtido, permaneceu em temperatura ambiente por 45 minutos, foi centrifugado e o soro resultante armazenado a -20°C , até a dosagem de colesterol total, LDL, VLDL, triacilgliceróis, insulina, leptina e glicose. A dosagem da fração HDL de colesterol foi feita em soro fresco, isto é, sem congelamento, no mesmo dia da coleta do sangue.

3.5. Retirada de órgãos e tecidos

Após a retirada de sangue os animais foram sacrificados e tiveram o fígado, as glândulas adrenais direita e esquerda, o tecido adiposo epididimal direito e esquerdo, os depósitos adiposos peri-renais e mesentérico retirados e pesados.

Os resultados foram expressos como peso úmido dos órgãos e tecidos e apresentados em porcentagem do peso corporal total do animal.

3.6. Avaliação das concentrações sangüíneas

3.6.1. Colesterol total

As concentrações sangüíneas de colesterol total foram avaliadas por colorimetria, com a utilização de *kit* comercial para dosagem de colesterol (Laborlab S/A Produtos para Laboratórios, Guarulhos, SP, Brasil). O método se baseia numa reação enzimática-colorimétrica utilizando as enzimas lipase, colesterol oxidase e peroxidase, para a determinação de colesterol no plasma ou soro (ABELL *et al.*, 1952; CASTELLI & LEVITAS, 1977). A leitura das absorbâncias de colesterol total é realizada no comprimento de onda de 505 nm. Para verificação da eficiência do *kit* nacional algumas amostras foram também analisadas por ensaio enzimático colorimétrico (Roche Diagnostics Gmgh, Indianapolis, IN, USA). Este método baseia-se na determinação da

Δ^4 -coletenona após clivagem enzimática do éster de colesterol pela colesterol-estearase, conversão do colesterol pela colesterol-oxidase e medição subsequente do peróxido de hidrogênio formado pela reação de Trinder (1969). Os resultados obtidos de amostras com os dois métodos foram semelhantes (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Média ($\pm$ EPM) da concentração de colesterol total (mg/dl) em plasma de ratos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos analisados com *kits* da Laborlab e Roche.

Normolipidêmicos		Hiperlipidêmicos	
LABORLAB	ROCHE	LABORLAB	ROCHE
37,9 $\pm$ 5,2 (6)	33,7 $\pm$ 1,8 (7)	80,8 $\pm$ 3,3 (6)*	75,9 $\pm$ 3,6 (8)*

Os números entre parênteses representam o número de animais. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos (test *t* de Student).

* $p < 0,05$, quando comparado ao seu respectivo controle (test *t* de Student)

3.6.2. Lipoproteínas

Os valores de HDL foram avaliados por colorimetria. Utilizamos *kit* comercial para dosagem de HDL (Laborlab S/A Produtos para Laboratórios, Guarulhos, SP, Brasil). Neste *kit* obtivemos a medida direta da concentração de HDL, cujo método preconizado pela "Lipid Research Clinic" (Atlanta, USA) emprega a precipitação com heparina/Mn⁺⁺ (CASTELLI & LEVITAS, 1977; GORDON *et al.*, 1977). A leitura das absorbâncias de HDL é realizada no comprimento de onda de 505 nm.

Calculamos os valores das concentrações de LDL e VLDL a partir das concentrações de HDL, utilizando as fórmulas de Friedewald (1972) e Alonso *et al.* (2001), respectivamente, especificadas a seguir:

$$\text{LDL (mg/dl)} = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

$$\text{VLDL (mg/dl)} = \frac{\text{Triacilgliceróis}}{5}$$

3.6.3. Triacilgliceróis

A concentração sanguínea de triacilgliceróis foi avaliada por colorimetria, com a utilização de *kit* comercial, método totalmente enzimático colorimétrico (Laborlab S/A Produtos para Laboratórios, Guarulhos, SP, Brasil).

O método tem o seguinte fundamento: a hidrólise dos triacilgliceróis é catalisada por uma lipase para a produção de glicerol e ácidos graxos livres. O glicerol gerado é depois fosforilado por adenosina 5'- trifosfato, em presença de gliceroquinase resultando glicerol-3-fosfato. Este sofre oxidação, catalizada pela enzima L-glicerol-3-fosfato oxidase produzindo água oxigenada. Um intenso cromógeno vermelho é produzido pela peroxidase que catalisa a reação oxidativa da 4-aminoantipirina e 2-hidroxi-3,5-diclorobenzenosulfonato de sódio com água oxigenada (FOSSATI & PRENCIPE, 1982; McGOWAN *et al.*, 1983). A leitura da absorbância de triacilgliceróis é realizada no comprimento de onda de 505 nm.

Para verificarmos a eficiência do *kit* nacional, algumas amostras foram também analisadas por ensaio colorimétrico, da Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA). Este método baseia-se no trabalho de Wahlefeld & Bergmeyer (1974), utilizando uma lipase lipoproteica de microrganismos para a hidrólise rápida e completa de triacilgliceróis em glicerol, com oxidação subsequente para fosfato de dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio gerado reage, então, com 4-aminofenazona e 4-clorofenol sob a ação catalítica da peroxidase e produz uma coloração vermelha (reação de viragem segundo Trinder, 1969). Embora exista uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras oriundas dos mesmos grupos, utilizando diferentes *kits*, o aumento na concentração de triacilgliceróis induzido pela ingestão da dieta não foi estatisticamente diferente, 1,56 e 1,4 vezes na concentração de triacilgliceróis quantificadas com os *kits* da Laborlab e Roche respectivamente (Tabela 3.2). Portanto, os dados mostram que, desde que use o mesmo kit, os resultados são confiáveis.

Tabela 3.2. Média ($\pm$ EPM) da concentração de triacilgliceróis (mg/dl) em plasma de ratos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos analisados com *kits* da Laborlab e Roche.

Normolipidêmicos		Hiperlipidêmicos	
LABORLAB	ROCHE	LABORLAB	ROCHE
23,6 $\pm$ 1,7 (6)	31,8 $\pm$ 1,8 (8) [#]	36,9 $\pm$ 3,5 (7)*	44,0 $\pm$ 2,8 (8) ^{*#}

Os números entre parênteses representam o número de animais.

[#] p<0,05, quando comparada a mesma amostra analisada por diferentes métodos (test *t* de Student).

* p<0,05, quando comparado ao seu respectivo controle (test *t* de Student)

3.6.4. Glicose

A glicemia foi avaliada por colorimetria, com a utilização de *kit* comercial (Laborlab S/A Produtos para Laboratórios, Guarulhos, SP, Brasil).

O método se baseia numa reação enzimática-colorimétrica utilizando-se a glicose oxidase e a peroxidase, para a determinação de glicose no soro ou plasma (TRINDER, 1969; HENRY *et al.*, 1974). A leitura da absorbância de glicose é realizada no comprimento de onda de 505 nm.

3.6.5. Leptina

Para determinação da concentração de leptina no soro, utilizou-se *kit* "Mouse Leptin ELISA Kit Instruction" (HARDIE *et al.*, 1996; Crystal Chem. Inc., Chicago " USA). A leitura das absorbâncias é realizada no comprimento de onda de 450 nm.

3.6.6. Insulina

As concentrações séricas de insulina foram avaliadas por radioimunoensaio (RIA), utilizando insulina humana marcada com iodo 125 (¹²⁵I), segundo Scott *et al.* (1981).

3.7. Índice aterogênico

O índice aterogênico (IA), o qual representa o risco potencial de morbidade adquirido pelo consumo da dieta com alto teor em lipídios, também foi determinado utilizando a seguinte fórmula (CHOI *et al.*, 1991):

$$IA = \frac{(\text{colesterol total} - \text{HDL})}{\text{HDL}}$$

3.8. Sensibilidade de adipócitos Isolados de ratos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados ou não com infuso a 5 ou 10% de Croton cajucara Benth

3.8.1. Preparo dos adipócitos e protocolo de incubação

Após a coleta de sangue para avaliação dos indicadores séricos, o pâncreas adiposo epididimal foi retirado dos animais normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados ou não com o infuso a 5 ou 10% das cascas de *C. cajucara*.

Os adipócitos foram isolados de acordo com o método de Rodbell (1964), com algumas modificações. Os fragmentos foram digeridos pela collagenase (1 mg/ml), em tampão Krebs-Ringer bicarbonato contendo 3% de soroalbumina bovina (KRBA) e 6 mM de glicose, em pH 7,4, durante incubação por 45 minutos a 37° C, sob agitação vigorosa (60 ciclos por minuto).

Após a digestão pela collagenase, o tecido adiposo foi filtrado através de um filtro de seda e lavado três vezes com tampão KRBA para eliminar a collagenase. O conteúdo celular foi ressuspensão em tampão KRBA em uma concentração celular de 10%. Neste ponto foram reunidos adipócitos ("pool" de adipócitos) de 2 ratos sob o mesmo tratamento para gerar quantidade suficiente de células a fim de realizarmos incubação com os diversos agentes lipolíticos, anti-lipolíticos e antagonistas de adrenoceptores. Nos experimentos em que utilizamos antagonistas de adrenoceptores, fizemos uma pré-incubação por 40 minutos com esses agentes e somente após esse período, acrescentamos o agonista. Portanto, nos experimentos em que se utilizaram agonistas e antagonistas, o tempo total de incubação celular foi de 100 minutos e,

naqueles onde utilizamos somente agonistas, o tempo de incubação foi de 60 minutos. Em todos os experimentos, independente do agente utilizado, a incubação foi realizada a 37°C, em banho-maria, com agitação de 60 ciclos por minuto. Os resultados foram apresentados em μmol de glicerol/60 minutos/100 mg de lipídios.

As curvas dose-resposta foram realizadas em duplicata, com isoprenalina (agonista não seletivo de β -adrenoceptores, nas concentrações de 1 nM até 100 μM), noradrenalina (agonista de β_1 -adrenoceptores, nas concentrações de 10 nM até 100 μM) ou BRL 37344 (agonista seletivo de β_3 -adrenoceptores, nas concentrações de 1 nM até 100 μM). Curvas dose-resposta aos mesmos agonistas de adrenoceptores também foram obtidas na presença de antagonista não seletivo de adrenoceptores β_1 e β_2 , propranolol, na concentração de 1 μM , do antagonista de adrenoceptores β_1 , metoprolol, na concentração de 1 μM ou do antagonista de adrenoceptores β_2 , ICI 118,551, na concentração de 50 nM. Estudo das etapas pós-receptor foram realizadas com a incubação dos adipócitos na presença do análogo sintético do AMPc, dibutilil-AMPc (3 μM).

O efeito anti-lipolítico da insulina foi avaliado através da indução de lipólise máxima pela noradrenalina (1 μM) e co-incubação com concentrações crescentes de insulina (1, 5, 10, 100 ou 500 $\mu\text{U/ml}$).

3.8.2. Medida da lipólise

Para a medida da lipólise, 500 μl do "pool" de adipócitos (cerca de 80 000 células) foram incubados em 500 μl de KRBA, a 37°C, com agitação de 60 ciclos por minuto. Os agentes farmacológicos citados acima foram adicionados à suspensão celular num volume de 10 μl . A adição dos agonistas definiu o início dos ensaios. Foram incubados dois tubos aos quais não foi adicionado qualquer agente farmacológico e sua leitura foi considerada como lipólise basal.

Após o período de incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo e alíquotas de 200 μl do infranadante foram retiradas para determinação enzimática do glicerol liberado no meio de incubação, que foi usado como indicativo da lipólise (WEILAND, 1957).

Curvas concentração-efeito para os agonistas foram obtidas e a concentração de agonista induzindo 50% da lipólise máxima (EC_{50}) foi calculada para a curva e expressa como pD_2 ($-\log EC_{50}$), utilizando o programa *Prisma Graph Pad* (San Diego, CA, USA).

3.8.3. Medida enzimática do glicerol

A medida do glicerol foi realizada enzimaticamente, segundo o método de Weiland (1957). O princípio da reação é o que segue:

- O glicerol sofre a ação da gliceroquinase (GK), tendo como cofator da reação a adenosina trifosfato (ATP), dando como produto, o glicerofosfato. Este, por sua vez, sofre a ação da glicerofosfato desidrogenase (GDH), tendo como cofator da reação a nicotinamida dinucliotídeo (NADH), dando origem a dihidroxiacetona fosfato. A adição de hidrazina torna esta reação irreversível.

Ao infranadante coletado após a incubação foram adicionados 500 μ l do seguinte coquetel: ATP, 75 mg; NAD, 37,5 mg; tampão hidrazina, 100 ml; GDH (19 mg/ml), 500 μ l e GK (5 mg/ ml) 40 μ l, sendo que cada dosagem acompanha uma curva padrão de glicerol (0,05 μ mol, 0,1 μ mol e 0,2 μ mol).

3.8.4. Extração de lipídios

A avaliação dos lipídios totais foi realizada gravimetricamente após a extração (DOLE & MEINERTZ, 1960), feita com uma mistura contendo heptano, isopropanol e ácido sulfúrico 1 N. Os lipídios extraídos localizam-se na fase do heptano. Foram colocados 5 ml desta mistura em contato com 500 μ l do "pool" de adipócitos e o tubo foi agitado, vigorosamente. Após cerca de 2 horas uma alíquota de 500 μ l foi tomada e evaporada completamente para determinação do peso total de lipídios, o qual foi utilizado para calcular os valores do glicerol liberado, que foram expressos em μ moles de glicerol/60 minutos de incubação/100 mg de lipídios totais.

3.8.5. Análise dos resultados

Foram obtidas curvas dose-resposta a cada um dos agonistas, na ausência e/ou presença dos diferentes antagonistas. A comparação das curvas permitiu avaliar

se houve alguma alteração na população de adrenocetores que medeia a resposta lipolítica às catecolaminas, em ratos normo ou hiperlipidêmicos que ingeriram infuso na concentração de 5% ou 10% das cascas de *C. cajucara* Benth.

Os deslocamentos das curvas dose-resposta aos agonistas, induzidos pelos antagonistas, foram utilizados para a análise farmacológica complementar da população de adrenocetores. Todas as análises e figuras foram feitas com o auxílio do Programa *Prisma Graph Pad* (San Diego, CA, USA).

3.9. *Histologia do tecido hepático*

Cerca de 4 amostras de aproximadamente 4 mm foram retiradas do lobo superior direito do fígado de cada rato. As amostras foram fixadas durante 24 horas em formol salina com a seguinte composição química: 200 ml de água destilada, 50 ml de formaldeído a 40% e 250 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4. Em seguida foram lavadas com álcool a 70%, permanecendo nesta solução até o dia da inclusão em parafina.

Para a inclusão, procedeu-se à desidratação em série crescente de álcool etílico até o álcool absoluto, à clarificação em xilol (álcool-xilol 1:1 e xilol puro), e à impregnação em xilol-parafina (1:1). Finalmente, foi realizada a inclusão e emblocagem a 58° C, em "Paraplast plus" (mistura de parafina, polímeros plásticos e dimetil-sulfóxido). Os cortes hepáticos devidamente incluídos foram colados em blocos de madeira e cortados na espessura de 5 µm em micrótomo "820" Spencer (American Optical Corporation, USA) ou cortes de 2 µm em micrótomo Leica RM 2145 (Leica® Microsystem, Nussloch, Alemanha). Cerca de 4 cortes foram colocados em cada lâmina. Após a desparafinização com xilol, hidratação e coloração com hematoxilina/eosina, as imagens foram capturadas em computador usando "Image Pró Plus Software" (Pró Series Capture Kit 640x480), com ampliação de 100 X.

Utilizamos também outra técnica de inclusão em que cerca de 10 amostras de aproximadamente 1 mm foram retiradas do lobo superior direito do fígado de cada rato. As amostras foram fixadas em formol cálcio de Becker, permanecendo nesta solução até o dia da inclusão em historesina (LEICA® Microsystems, Nussloch,

Heidelberge, Alemanha). Os cortes foram colados em blocos de madeira e cortados em espessura de 1 a 2 μm em micrótomo automático. Cerca de 4 cortes foram colocados em cada lâmina e os mesmos foram corados com Sudan Black B. As imagens também foram capturadas em computador, usando "Image Pró Plus Software" (Pró Series Capture Kit 640x480), com ampliação de 100 X.

3.10. Análise estatística

Os dados estão apresentados como médias $\pm$ EPM. Números entre parênteses representam o número de ratos utilizados. A comparação entre os diferentes grupos foi feita por Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey. Utilizou-se também o teste *t* de Student quando adequado. Valores de *p* menores ou iguais a 5% foram aceitos como indicativos de diferenças estatisticamente significativas. Estas análises foram realizadas utilizando o programa *Prisma Graph Pad*.

As imagens histológicas das amostras hepáticas, foram capturadas em computador, usando "Image Pró Plus Software" (Pró Series Capture *Kit* 640x480), com ampliação de 100 X, onde foram analisadas morfométricamente.

4. RESULTADOS

Iniciamos nossos estudos administrando durante 15 dias o infuso obtido das cascas de *Croton cajucara* Benth na concentração de 5% para ratos adultos (12 – 14 semanas de idade). Analisamos o efeito deste tratamento sobre a evolução ponderal, consumo alimentar e hídrico, concentrações plasmáticas de colesterol total, glicose e triacilgliceróis. Estudamos também a sensibilidade a agonistas β -adrenérgicos em adipócitos epididimais isolados de ratos submetidos a este tratamento. Parte destes resultados foi publicada no *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Uma cópia deste artigo se encontra em anexo nesta tese e estão descritos no item 4.1.

Em seguida, iniciamos os experimentos de indução de hiperlipidemia através da dieta em ratos. Verificamos que o quadro de dislipidemia se instalava somente quando a dieta era oferecida a animais mais jovens, com seis semanas de idade. Foi então necessária a realização de um grupo experimental composto de animais normolipidêmicos jovens tratados com infuso a 5% para verificar se os efeitos observados nos animais adultos se repetiam. Neste grupo experimental os seguintes parâmetros foram avaliados: evolução ponderal, consumo alimentar, calórico e hídrico, peso do pâncreas adiposo epididimal, bem como sensibilidade a agonistas β -adrenérgicos em adipócitos epididimais isolados. O infuso a 5% não provocou em ratos jovens os efeitos observados em ratos adultos normolipidêmicos. Aumentamos a concentração do infuso para 10% e repetimos os experimentos. Os resultados destes experimentos em ratos normolipidêmicos bem como aqueles, nesta mesma faixa de idade e concentração de infuso, obtidos de ratos hiperlipidêmicos estão descritos nos itens 4.2 e 4.3.

Ratos jovens se tornaram dislipidêmicos após ingerirem dieta rica em lipídios por quatro semanas. A partir de então, quando apresentavam 10 semanas de idade, os ratos foram tratados durante 15 dias com o infuso obtido a partir das cascas de *Croton cajucara* Benth, na concentração de 10%. Nestes experimentos com animais jovens, dislipidêmicos ou não, tratados ou não com o infuso (10%) foram analisados: evolução ponderal, consumo alimentar, calórico e hídrico, concentrações séricas de colesterol total e suas frações (HDL, LDL e VLDL), de triacilgliceróis, de glicose, de leptina, de insulina, além do índice aterogênico. Ainda nestes animais, avaliamos o peso dos

panículos adiposos epididimal, mesentérico e peri-renal, das adrenais e do fígado. A morfologia do tecido hepático foi avaliada através de análise histológica. Avaliamos também a sensibilidade a agonistas β -adrenérgicos em adipócitos epididimais isolados. A sensibilidade à insulina foi avaliada no grupo hiperlipidêmico. Análises histológicas de tecido hepático oriundo de ratos pertencentes aos diferentes grupos experimentais foram também analisadas.

4.1. Efeito do tratamento com infuso a 5% de Croton cajucara Benth. em ratos adultos normolipidêmicos (AN)

4.1.1. Peso corporal, consumo de ração e de líquido

Ratos normolipidêmicos que ingeriram água apresentaram significativo aumento no peso corporal ($31,7 \pm 6,4$ g ou 7%) comparado ao peso no início do experimento ($p < 0,05$), enquanto que os animais tratados com infuso de *C. cajucara* a 5% não apresentaram significativo ganho de peso corporal ($13,5 \pm 7,9$ g ou 3%) comparado ao dia zero (Tabela 1).

Tabela 1. Média de peso corporal (g) de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.

GRUPOS	DIA ZERO	14° DIA
ANA (12)	327 ± 23	358 ± 29*
ANI-5 (24)	325 ± 11	338 ± 18 [#]

Os valores representam a média do peso corporal (g) ± EPM dos animais normolipidêmicos água (ANA) e infuso (ANI-5) no "dia zero" e no 14° dia de tratamento ou não com infuso a 5%. Valores entre parênteses representam o número de animais utilizados.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo normolipidêmico água no "dia zero".

[#] $p < 0,05$ comparado ao grupo normolipidêmico água no 14° dia e $p > 0,05$ comparado ao grupo ANI-5 no dia zero; ANOVA seguida de teste de Tukey.

Apesar da ausência de ganho de peso corporal dos animais do grupo tratado com o infuso, a média diária de consumo de ração não foi significativamente diferente entre os dois grupos, durante o tempo de experimento (Tabela 2).

A ingesta de líquido entre os dois grupos também não foi diferente durante todo o tempo de experimento (Tabela 2).

A desidrocrottonina está presente nas cascas de *C. cajucara* numa proporção de aproximadamente 0,65% (Simões *et al.*, 1979; Itokawa *et al.*, 1989; Kubo *et al.*, 1991; Maciel *et al.*, 1998a). Considerando que toda a DHC presente nas cascas seja extraída para a água, a preparação do infuso a 5% deve conter 0,32 mg deste composto em cada mililitro ou 0,64 mg/ml no infuso a 10%. Portanto através do controle diário da ingesta hídrica, pudemos estimar a quantidade de DHC ingerida pelos ratos do grupo normolipidêmico tratado com o infuso a 5%, ou seja, uma dose diária equivalente a $13,46 \pm 0,44$ mg (n=24) de DHC.

A análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de ^{13}C), realizada em nosso próprio grupo de pesquisas, mostrou que a DHC é a principal substância presente no liofilizado do infuso obtido das cascas. Assim, a DHC

tem uma grande probabilidade de ser responsável pelas atividades observadas no decorrer desta pesquisa.

Tabela 2. Média ($\pm$ EPM) do consumo diário de ração (g/rato) e de líquido (ml/rato) por ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente) no início ("dia zero") e no final (14º dia) dos experimentos. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.

GRUPOS	RAÇÃO		LÍQUIDO	
	DIA ZERO	14º DIA	DIA ZERO	14º DIA
ANA (12)	30,6 $\pm$ 1,3	31,2 $\pm$ 2,3	42,4 $\pm$ 3,4	41,4 $\pm$ 5,6
ANI-5 (24)	32,6 $\pm$ 1,3	31,7 $\pm$ 1,3	49,9 $\pm$ 4,9	41,2 $\pm$ 3,3

Valores entre parênteses representam o número de animais utilizados.
Nenhum dos valores apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.1.2. Concentrações plasmáticas de colesterol total, triacilgliceróis e glicose

A administração do infuso (5%) durante 15 dias em substituição à água de beber em animais adultos, acarretou redução significativa nas concentrações plasmáticas de colesterol total e de glicose. O mesmo tratamento não alterou as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações plasmáticas (mg/dl) de colesterol total, de triacilgliceróis (TAG) e de glicose obtidas em ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.

GRUPOS	COLESTEROL TOTAL	TAG	GLICOSE
ANA (12)	41,4 ± 2,9	42,7 ± 5,2	101,8 ± 8,1
ANI-5 (24)	30,2 ± 1,9*	40,9 ± 2,8	84,9 ± 4,6*

Os valores representam a média ± EPM. O sangue foi coletado em seringa heparinizada após jejum de 16 horas.

Valores entre parênteses representam o número de ratos utilizados.

* $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo normolipidêmico que ingeriu água (ANA); teste t de Student.

4.1.3. Sensibilidade aos agonistas β -adrenérgicos em adipócitos epididimais

Os panículos adiposos epididimais dos ratos foram isolados e pesados, individualmente. A porcentagem de pânículo adiposo epididimal em relação ao peso corporal foi estabelecida (Tabela 4).

Embora houvesse diferença significativa no peso corporal dos animais dos grupos estudados, o tratamento com infuso não alterou significativamente a quantidade do pânículo adiposo epididimal. A proporção do peso do pânículo epididimal em relação ao peso corporal desses animais também não apresentou diferença significativa (Tabela 4).

Tabela 4. Médias do peso corporal (g), pânículo adiposo epididimal (g) e sua porcentagem (%) em relação ao peso corporal dos ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.

GRUPOS	PESO CORPORAL	PANÍCULO ADIPOSEO	% PESO CORPORAL
ANA (12)	358,7 ± 29,3	4,45 ± 0,31	1,24 ± 0,08
ANI-5 (24)	338,5 ± 18,9 [#]	3,96 ± 0,29	1,17 ± 0,08

Os valores representam a média ± EPM.

Números entre parênteses correspondem ao número de ratos utilizados.

[#] $p < 0,05$ em comparação aos animais normolipidêmicos que ingeriram água (NA); teste t de Student.

O tratamento de ratos adultos com o infuso não alterou a liberação basal de glicerol em adipócitos epididimais isolados destes animais comparados com aqueles de ratos controle (tratados: $0,87 \pm 0,09$ μmol de glicerol liberado/60 minutos/100mg de lipídios totais; controle: $0,94 \pm 0,15$ μmol de glicerol liberado/60 minutos/100mg de lipídios totais; $p > 0,05$, teste t de Student).

Os adipócitos epididimais isolados de ratos adultos tratados com infuso a 5% foram supersensíveis à isoprenalina e à adrenalina sem alteração significativa na resposta máxima a estes agonistas (Tabela 5; Figuras 1 e 2, respectivamente). O tratamento com o infuso não alterou a sensibilidade (pD_2) nem a resposta máxima (RM) dos adipócitos à noradrenalina ou ao BRL37344 no meio de incubação (Tabela 5; Figuras 3 e 4, respectivamente).

A pré-incubação dos adipócitos com antagonista de adrenoceptores β_1 (metoprolol, 1 μM) causou deslocamento na curva dose-resposta à isoprenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos normolipidêmicos que ingeriram água sem

alterar a curva dose-resposta obtida em adipócitos epididimais isolados de ratos tratados com infuso a 5% (Figura 1). O metoprolol também desviou para a direita a curva dose-resposta à noradrenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos normolipidêmicos tratados ou não com o infuso, sem alterar de maneira significativa a resposta máxima para este agonista (Tabela 5; Figura 3).

O antagonismo dos adrenoceptores do subtipo β_2 (ICI118551, 50 nM) não teve efeito sobre a curva dose-resposta à isoprenalina de adipócitos epididimais isolados de ratos normolipidêmicos que ingeriram água (Tabela 5; Figura 1). Entretanto, este antagonista β_2 -adrenérgico desviou a curva dose-resposta à isoprenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos tratados com o infuso (Figura 1). A presença deste antagonista não acarretou qualquer alteração nas curvas dose-resposta à noradrenalina em adipócitos isolados de ratos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso (Tabela 5; Figura 3).

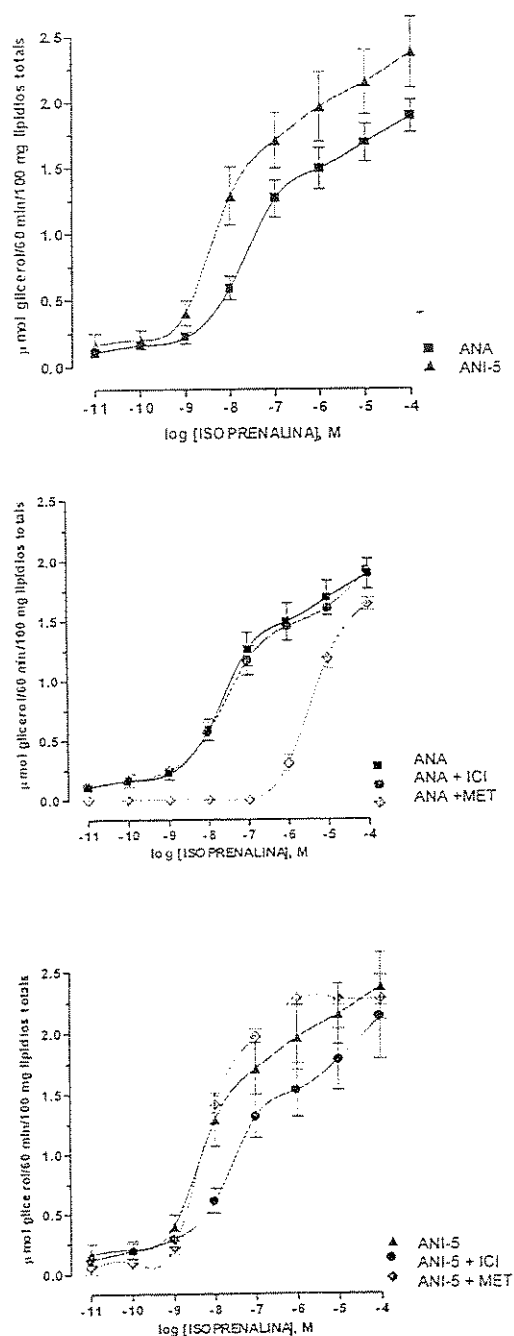
Tabela 5. Sensibilidade (pD_2) e resposta lipolítica máxima (RM) para à isoprenalina, noradrenalina, adrenalina e BRL37344 na ausência ou na presença de antagonistas de adrenoreceptores β_1 ou β_2 em adipócitos epididimais isolados de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias

ANA				ANI-5			
	pD ₂ ^a	RM ^b	n		pD ₂ ^a	RM ^b	n
BRL37344	8,91 ± 0,19	1,42 ± 0,26	7		8,99 ± 0,22	1,53 ± 0,11	9
ISOPRENALINA							
SEM ANTAGONISTA	7,67 ± 0,18	1,84 ± 0,11	11		8,16 ± 0,12*	2,37 ± 0,32	9
+ METOPROLOL (1 µM)	5,43 ± 0,19**	1,64 ± 0,18	3		8,16 ± 0,01	3,85 ± 0,71	3
+ ICI118551 (50 nM)	7,56 ± 0,12	1,74 ± 0,10	6		7,87 ± 0,20**	1,47 ± 0,19	5
NORADRENALINA							
SEM ANTAGONISTA	6,87 ± 0,07	1,62 ± 0,17	8		6,96 ± 0,11	1,55 ± 0,18	9
+ METOPROLOL (1 µM)	6,68 ± 0,14**	1,69 ± 0,29	4		6,73 ± 0,16**	1,89 ± 0,14	7
+ ICI118551 (50 nM)	6,76 ± 0,08	1,67 ± 0,12	6		6,98 ± 0,08	1,14 ± 0,17	5
ADRENALINA	5,71 ± 0,12	1,52 ± 0,11	7		6,68 ± 0,27*	1,78 ± 0,25	8

^a logarítimo negativo da concentração do agonista que induz 50% da resposta lipolítica máxima (-log EC₅₀);

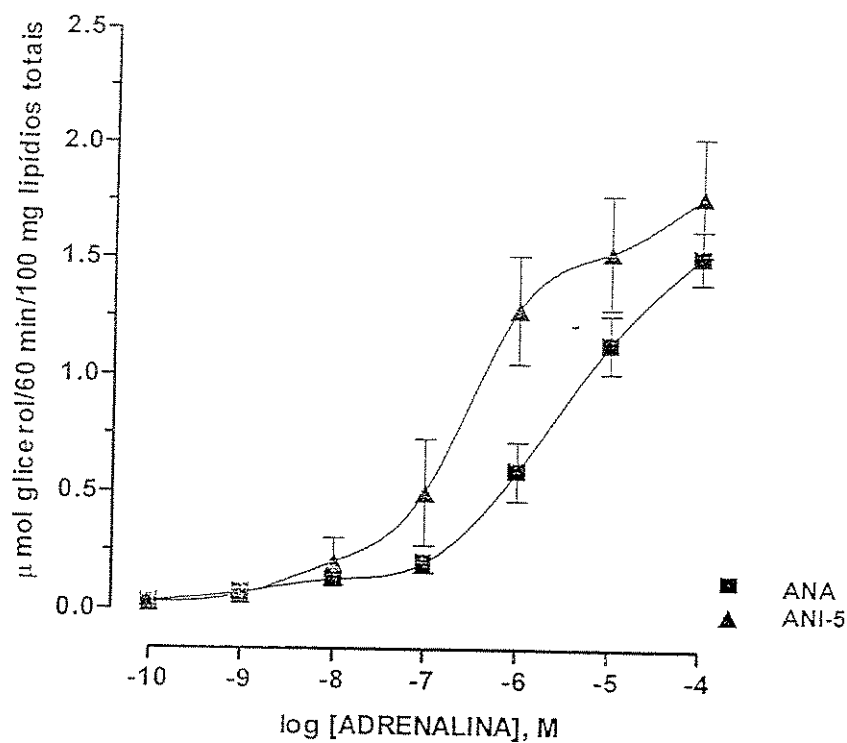
^b resposta máxima expressa como µmol de glicerol liberado/60 minutos/100mg de lipídios totais. Os valores são expressos por médias ± EPM do número de experimentos realizados em duplicatas. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo ANA; ** $p < 0,05$ em comparação ao mesmo grupo sem antagonista; teste t de Student.

Figura 1. Curvas dose-resposta à isoprenalina na ausência ou na presença dos antagonistas ICI118551 (50 nM; ICI) ou metoprolol (1 μ M; MET) em adipócitos epididimais isolados de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



Os pontos são médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata.
O número de experimentos e a análise estatística estão descritos na Tabela 5.

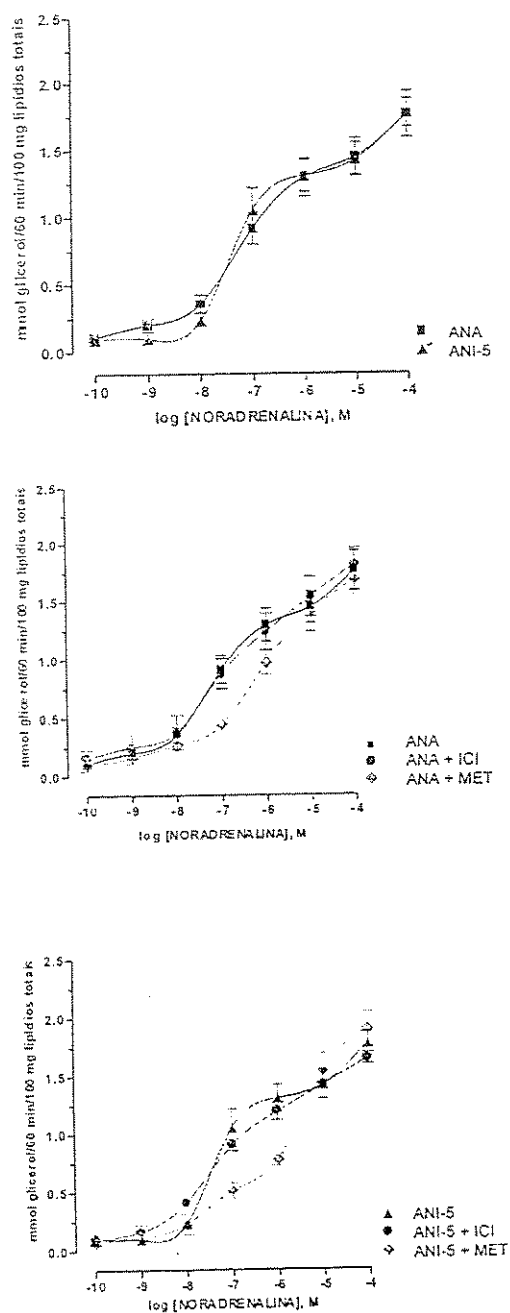
Figura 2. Curvas dose-resposta à adrenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



Os pontos são médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata.

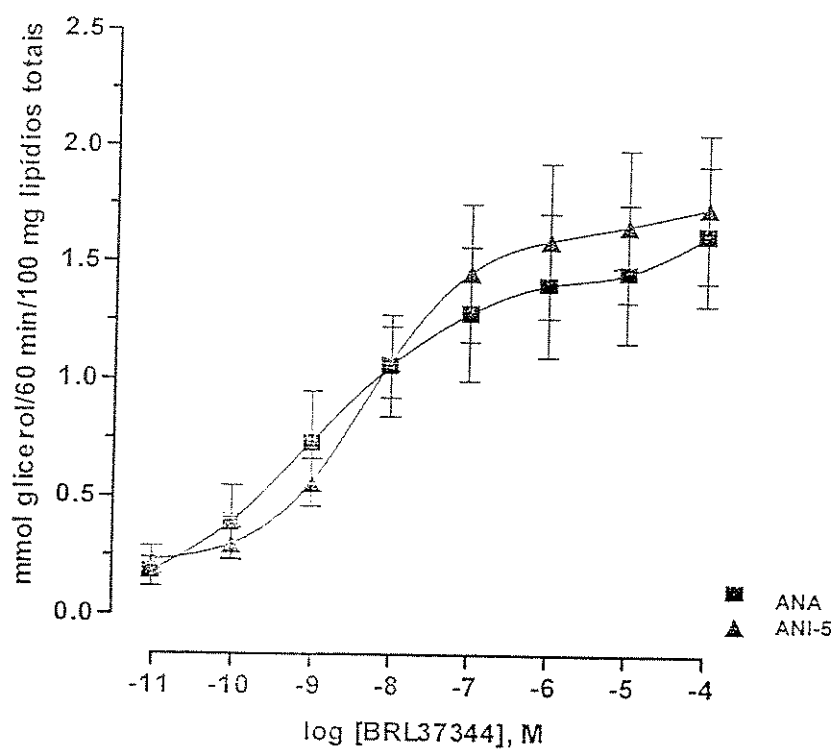
O número de experimentos e a análise estatística estão descritos na Tabela 5

Figura 3. Curvas dose-resposta à noradrenalina na ausência ou presença dos antagonistas ICI118551 (50 nM, ICI) ou metoprolol (1 μ M, MET) em adipócitos epididimais isolados de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



Os pontos são médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata.
O número de experimentos e a análise estatística estão descritos na Tabela 5.

Figura 4. Curvas dose-resposta ao BRL37344 em adipócitos epididimais isolados de ratos adultos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (ANA e ANI-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



Os pontos são médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata.
O número de experimentos e a análise estatística estão descritos na Tabela 5.

4.2 Indução da hiperlipidemia em ratos por ingestão de dieta com alto teor de lipídio (15%)

Inicialmente administramos a dieta com alto teor de lipídio (15%), durante quatro semanas, a ratos adultos machos iniciando o tratamento na décima semana de idade, e observamos que não houve alteração significativa nas concentrações séricas de colesterol total (CT), mesmo a dieta sendo enriquecida de ácido cítrico (CT de ratos com dieta contendo 4% de lipídio: $41,4 \pm 3,5$ mg/dl, $n = 4$ e de ratos com dieta contendo alto teor de lipídio: $52,9 \pm 6,5$ mg/dl, $n = 4$). Em seguida, administramos a dieta, durante 4 semanas para ratos machos jovens (seis semanas de idade). Observamos, então, a instalação do quadro de hiperlipidemia na décima semana de idade (CT de ratos com dieta contendo 4% de lipídio: $39,1 \pm 3,9$ mg/dl, $n = 11$ e de ratos com dieta contendo alto teor de lipídio: $92,1 \pm 6$ mg/dl, $n = 15$). Assim sendo, estabelecemos este protocolo para indução de dislipidemia pela dieta em ratos.

Um grupo normolipidêmico composto de animais jovens foi submetido ao tratamento com infuso a 5% para verificarmos se os efeitos do tratamento eram alterados com a idade. Os resultados mostraram que ratos jovens são resistentes aos efeitos do infuso nesta concentração.

Assim sendo, após a instalação do quadro de hiperlipidemia, os ratos foram tratados com infuso nas concentrações de 10% durante mais duas semanas ou até a décima segunda semana de idade. No período de tratamento com o infuso os ratos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos continuaram a receber as respectivas dietas.

4.3. Efeito do tratamento com infuso a 5 ou 10% de Croton cajucara em ratos jovens normo- e hiperlipidêmicos

4.3.1. Peso corporal, consumo de ração e de líquido

Após quatro semanas ingerindo as respectivas rações, quando os animais estavam com 10 semanas de idade, tanto os ratos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5 ou a 10%, quanto os ratos hiperlipidêmicos, que ingeriram água e

infuso a 10%, apresentaram ganho de peso significativo em relação ao primeiro dia da pesagem (Tabela 6).

Após as duas semanas de tratamento ou não com o infuso, quando todos os animais estavam com 12 semanas de idade, tanto os ratos normolipidêmicos como os ratos hiperlipidêmicos apresentaram ganho de peso significativo em relação à décima semana de idade (Tabela 6). A administração da dieta contendo 15% de gordura por mais esses 15 dias, também não alterou o ganho de peso em relação ao grupo que ingeriu a dieta com 4% de lipídio e nem o tratamento com o infuso nas diferentes concentrações alterou este quadro (Tabela 6).

Tabela 6. Médias de peso corporal (g) entre os ratos jovens que consumiram ração com 4% (JN) ou 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, os ratos dos grupos JN1-5, JN1-10 e JH1-10 receberam infuso a 5 ou a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth durante 15 dias em substituição a água de beber. Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA-5, JNA-10 e JHA-10.

GRUPOS/IDADE	6 SEMANAS	10 SEMANAS	12 SEMANAS
JNA-5 (5-10)	145,0 ± 7,0	239,0 ± 5,1*	266,0 ± 5,0 [#]
JNA-10 (4-18)	157,5 ± 3,0	269,1 ± 7,6*	281,9 ± 7,4 [#]
JN1-5 (4-6)	152,0 ± 9,8	252,0 ± 3,6*	270,6 ± 7,1 [#]
JN1-10 (5-18)	158,8 ± 4,7	269,0 ± 6,6*	284,0 ± 5,0 [#]
JHA-10 (11-25)	148,8 ± 4,0	260,1 ± 6,6*	284,1 ± 9,0 [#]
JH1-10 (12-25)	149,8 ± 6,0	268,1 ± 7,6*	278,9 ± 6,0 [#]

Valores entre parênteses correspondem ao número de animais utilizados.

* $p < 0,05$ em comparação aos pesos corporais da 6ª semana de idade; [#] $p < 0,05$ em comparação aos pesos corporais da 10ª semana de idade; ANOVA seguida de teste de Tukey

A administração de infuso a 5 ou a 10% aos ratos normolipidêmicos não alterou o consumo diário de ração (Tabela 7). Entretanto, os ratos que receberam ração

com alto teor de lipídio consumiram menor quantidade de ração o que resultou em menor ingesta calórica quando comparados com os animais que receberam ração balanceada. Além disso, a associação da dieta hiperlipídica com o infuso a 10% resultou em redução adicional na quantidade de ração consumida e, conseqüentemente, da ingesta calórica (Tabela 7).

Não foi observada diferença significativa na ingesta líquida entre os animais que ingeriram água ou infuso a 5 ou a 10%, alimentados com qualquer das duas dietas (Tabela 7).

Conforme já mencionado anteriormente a desidrocrotonina está presente nas cascas de *C. cajucara* numa proporção de aproximadamente 0,65% (Simões *et al.*, 1979; Itokawa *et al.*, 1989; Kubo *et al.*, 1991; Maciel *et al.*, 1998a). Considerando que toda a DHC presente nas cascas seja extraída para a água, a preparação do infuso a 5% deve conter 0,32 mg deste composto em cada mililitro ou 0,64 mg/ml no infuso a 10%. Portanto através do controle diário da ingesta hídrica, pudemos estimar a quantidade de DHC ingerida pelos ratos do grupo normolipidêmico, nesta faixa etária, tratado com o infuso a 5% ou a 10%, ou seja, uma dose diária equivalente a $10,26 \pm 0,48$ (n=24) e $22,52 \pm 1,13$ (n=18) mg de DHC, respectivamente.

A análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de ^{13}C), realizada em nosso próprio grupo de pesquisas, mostrou que a DHC é a principal substância presente no liofilizado do infuso obtido das cascas. Assim, a DHC tem uma grande probabilidade de ser responsável pelas atividades observadas no decorrer desta pesquisa.

Tabela 7. Médias diárias de consumo alimentar (g), ingesta calórica (Kcal) e ingesta líquida (ml) de ratos jovens que receberam dieta com 4% (JN) ou com 15% de lipídio (JH) durante 6 semanas. Nas últimas duas semanas, os ratos dos grupos JN1-5, JN1-10 e JH1-10 receberam infuso a 5 ou a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth em substituição à água de beber. Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA-5, JNA-10 e JHA-10.

GRUPOS	INGESTA ALIMENTAR	INGESTÃO CALÓRICA	CONSUMO LÍQUIDO
JNA-5 (10)	34,1 ± 2,8	135,0 ± 11,1	34,9 ± 2,6
JNA-10 (17)	35,3 ± 1,3	140,1 ± 6,8	35,9 ± 1,3
JN1-5 (6)	32,3 ± 1,2	128,0 ± 4,4	38,7 ± 1,4
JN1-10 (18)	35,9 ± 1,8	142,4 ± 8,1	37,5 ± 1,8
JHA-10 (17)	23,8 ± 1,0*	114,1 ± 5,1**	36,2 ± 1,2
JH1-10 (23)	20,5 ± 0,7*#	98,8 ± 3,3**#	36,1 ± 1,2

Valores entre parênteses correspondem ao número de animais utilizados.

* $p < 0,05$ em comparação a ingesta alimentar dos ratos normolipidêmicos e ** $p < 0,05$ em comparação ao consumo calórico dos ratos normolipidêmicos; ANOVA seguida de teste de Tukey.

$p < 0,05$ em comparação ao consumo alimentar dos ratos do grupo JHA-10, test t de Student.

Considerando que a ração hiperlipídica é oferecida aos ratos na forma de pó, enquanto a ração comercial se apresenta na forma peletizada, sugeriu-se que esta poderia ser a causa de menor consumo. Para verificar esta hipótese, oferecemos a um grupo de ratos a ração comercial também moída durante igual período. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes grupos e aqueles que receberam a ração peletizada ($p > 0,05$, Tabela 8).

Tabela 8. Média ($\pm$ EPM) de consumo diário de ração balanceada (g) moída e peletizada durante 6 semanas, entre ratos normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 10% (JNA e JNI-10, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.

GRUPOS	RAÇÃO	
	Moída	Peletizada
JNA (3)	33,0 $\pm$ 2,3	35,3 $\pm$ 1,3
JNI-10 (3)	32,4 $\pm$ 2,3	35,9 $\pm$ 1,8

Valores entre parênteses correspondem ao número de animais utilizados.
 $p > 0,05$; teste t de Student.

4.3.2 Dosagens séricas e índice aterogênico

As concentrações séricas de colesterol total em ratos normolipidêmicos (JNA; JNI) e hiperlipidêmicos (JHA; JHI) na 6ª semana de idade, correspondem ao valor basal para todos os grupos, visto que não havia, nesta idade, qualquer manipulação ou tratamento aplicado aos animais (JN: 38,9 $\pm$ 6,7 mg/dl, $n=5$ e JH: 39,6 $\pm$ 6,2 mg/dl, $n=5$). Estes valores não diferem significativamente daqueles apresentados na Tabela 3 para ratos normolipidêmicos adultos (41,4 $\pm$ 2,9 mg/dl).

Na 10ª semana de idade ocorreu elevação das concentrações séricas de colesterol total nos ratos alimentados com ração contendo alto teor de lipídio (JHA-10:

80,8 ± 3,3 mg/dl, n=6 e JHI-10: 78,6 ± 5,4 mg/dl, n=5), quando comparados aos animais normolipidêmicos (JNA-10: 37,9 ± 5,2 mg/dl, n=6 e JNI-10: 40,5 ± 6,4 mg/dl, n=5). Estes últimos permaneceram com taxas semelhantes àquelas observadas na 6ª semana de idade, ou início da dieta. Após 2 semanas de tratamento ou não com o infuso a 10%, tanto os animais hiperlipidêmicos, quanto os animais normolipidêmicos, mantiveram os mesmos parâmetros das concentrações séricas de colesterol da décima semana (Tabela 9).

As frações do colesterol foram analisadas ao final de todos os tratamentos. O consumo de dieta com alto teor de lipídio, durante 6 semanas, não modificou as concentrações séricas da fração HDL de colesterol. O tratamento com infuso a 10% durante 15 dias entre os animais não alterou as concentrações séricas desta fração de colesterol em ratos normolipidêmicos ou hiperlipidêmicos (Tabela 9).

Entretanto, o consumo de ração com alto teor de lipídio acarretou elevação das concentrações séricas de LDL e de VLDL. O tratamento com infuso a 10% não alterou as concentrações séricas destas frações de colesterol em nenhum dos grupos (Tabela 9).

As concentrações séricas de triacilgliceróis em ratos normolipidêmicos (JNA; JNI) e hiperlipidêmicos (JHA; JHI) na 6ª semana de idade, correspondem ao valor basal para todos os grupos (JN: 24,1 ± 0,6 mg/dl, n=3 e JH: 24,0 ± 0,7 mg/dl, n=3).

A ingestão da dieta contendo alto teor de lipídio durante quatro semanas elevou significativamente as concentrações séricas de triacilgliceróis (JHA-10: 36,9 ± 3,5 mg/dl, n=7 e JHI-10: 31,8 ± 1,8 mg/dl, n=6), quando comparados aos animais normolipidêmicos, os quais permaneceram com taxas observadas na 6ª semana de idade, ou início da dieta (JNA-10: 23,6 ± 1,7 mg/dl, n=6 e JNI-10: 21,3 ± 3,5 mg/dl, n=5). Após as duas semanas de tratamento ou não com o infuso a 10%, tanto os animais hiperlipidêmicos, quanto os animais normolipidêmicos, mantiveram os mesmos parâmetros das concentrações séricas de triacilgliceróis observadas na décima semana de idade (Tabela 9).

O índice aterogênico (IA) é uma medida bastante utilizada na clínica como indicativo do fator de risco de doenças cardiovasculares. Este índice baseia-se na relação entre níveis séricos de colesterol total e lipoproteínas de alta densidade.

Animais normolipidêmicos tratados com infuso a 10%, não apresentaram índice aterogênico estatisticamente diferente comparados aos ratos normolipidêmicos que beberam água (Tabela 9). Ratos hiperlipidêmicos apresentaram índice aterogênico significativamente maior comparado aos normolipidêmicos. O tratamento com o infuso a 10%, diminuiu o índice aterogênico dos animais hiperlipidêmicos. Este não apresenta diferença estatisticamente significativa do normolipidêmico (Tabela 9).

Tabela 9. Concentrações séricas (mg/dl) de colesterol total, HDL-Co, LDL-Co, VLDL-Co, triacilgliceróis e índice aterogênico de ratos jovens que consumiram dieta com 4% (JN) ou 15% de lipídio (JH) durante 6 semanas. Nas duas últimas semanas, os ratos dos grupos JN-10 e JH-10 receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber. Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA.

DOSAGENS/GRUPOS	JNA (8-17)	JNI-10 (7-18)	JHA (7-22)	JHI-10 (11-23)
COLESTEROL TOTAL	35,4 ± 1,9	29,6 ± 1,2	77,3 ± 3,6*	79,2 ± 3,7*
HDL-Co	14,8 ± 1,3	14,9 ± 2,1	16,3 ± 1,1	16,7 ± 0,9
LDL-Co	13,8 ± 2,8	12,5 ± 1,4	57,5 ± 7,3*	52,7 ± 4,5*
VLDL-Co	4,8 ± 0,4	5,2 ± 0,7	7,5 ± 0,4*	8,3 ± 0,5*
TRIACILGLICERÓIS	23,8 ± 2,3	25,8 ± 3,2	37,6 ± 2,1*	41,3 ± 2,6*
ÍNDICE ATEROGÊNICO	1,43 ± 0,25	1,71 ± 0,28	4,70 ± 1,1*	3,39 ± 0,26

Os valores são expressos em médias ± EPM.

Valores entre parênteses correspondem ao número de animais utilizados.

Índice aterogênico= (Colesterol total – HDL)/HDL

* $p < 0,05$ em comparação aos animais normolipidêmicos; ANOVA seguida de teste de Tukey

As concentrações séricas de glicose observadas entre os ratos jovens normolipidêmicos (JNA; JNI-10) e hiperlipidêmicos (JHA; JHI-10) na 6ª semana de idade foram iguais a $94,3 \pm 8,7$ mg/dl (n=7) e $91,6 \pm 7,9$ mg/dl (n= 7), respectivamente.

A administração da dieta contendo alto teor de lipídios durante quatro semanas para os ratos não acarretou qualquer alteração nas concentrações séricas de glicose (JNA: $96,4 \pm 5,8$ mg/dl, n= 5; JNI-10: $94,4 \pm 4,8$ mg/dl, n= 5; JHA: $100,6 \pm 5,0$ mg/dl, n= 5; JHI-10: $99,7 \pm 5,3$ mg/dl, n= 4). O tratamento com infuso a 10% não alterou os valores da glicemia (Tabela 10).

As concentrações séricas de insulina e de leptina foram analisadas após todos os tratamentos e estão apresentadas na Tabela 10. O tratamento com dieta hiperlipidêmica durante 6 semanas acarretou aumento significativo nas concentrações séricas de insulina quando comparadas aos valores obtidos do grupo normolipidêmicos. O tratamento com infuso a 10% não alterou a hiperinsulinemia observada em ratos hiperlipidêmicos.

O tratamento com dieta hiperlipidêmica ou com o infuso a 10% não acarretou qualquer alteração nas concentrações séricas de leptina (Tabela 10).

Tabela 10. Concentrações séricas de glicose (mg/dl), de insulina (ng/ml) e de leptina (ng/ml) dos ratos jovens que ingeriram ração com 4% (JN) ou com 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% das cascas de *C. cajuca* Benth, em substituição à água de beber (JN-10 e JH-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA.

GRUPOS	GLICOSE	INSULINA	LEPTINA
JNA (4-12)	104,2 ± 4,8	0,79 ± 0,03	0,98 ± 0,16
JNI-10 (4-12)	106,2 ± 5,8	0,76 ± 0,02	0,66 ± 0,09
JHA (9-11)	99,6 ± 5,1	1,45 ± 0,19*	0,71 ± 0,14
JHI-10 (4-16)	92,8 ± 4,1	1,64 ± 0,17*	0,78 ± 0,19

Os valores são expressos em médias ± EPM.

Valores entre parênteses correspondem ao número de animais utilizados.

* $p < 0,05$ em comparação aos animais normolipidêmicos; ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.3.3. Panículos adiposos epididimal, peri-renal e mesentérico

Embora a ingesta de dieta hiperlipídica não tenha resultado em diferença estatisticamente significativa no peso corporal, ocorreu aumento significativo no peso dos panículos adiposos (PA) epididimal e perirenal. O peso do pânículo adiposo da região mesentérica não foi alterado. O tratamento com infuso não alterou estes resultados (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Médias do peso corporal (g), pânículo adiposo epididimal (PA; g) e sua porcentagem (%) em relação ao peso corporal dos ratos jovens que ingeriram ração com 4% (JN) ou com 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 5 ou a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-5, JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA-5, JNA-10 e JHA-10.

GRUPOS	PESO CORPORAL	PA EPIDIDIMAL	% PESO CORPORAL
JNA-5 (10)	266,0 ± 4,8	2,81 ± 0,21	1,05 ± 0,07
JNA-10 (19)	281,8 ± 7,0	2,85 ± 0,24	0,99 ± 0,07
JNI-5 (5)	269,7 ± 7,9	2,41 ± 0,36	0,90 ± 0,13
JNI-10 (20)	265,6 ± 5,0	2,48 ± 0,17	0,93 ± 0,05
JHA-10 (7)	307,7 ± 16,0	4,36 ± 0,41*	1,41 ± 0,09*
JHI-10 (15)	288,5 ± 4,5	3,63 ± 0,18*	1,26 ± 0,07*

Os valores são expressos em médias ± EPM. Valores entre parênteses correspondem ao número de animais utilizados.* p<0,05 em comparação aos respectivos animais normolipidêmicos; ANOVA seguida de teste de Tukey.

Tabela 12. Médias do peso corporal (g) e do pâncreo adiposo (PA) da região peri-renal e mesentérica (g), bem como as porcentagens (%) em relação ao peso corporal, dos ratos jovens que consumiram ração com 4% (JN) ou com 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JN1-10 e JH1-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA.

GRUPOS	PESO CORPORAL	PA PERI-RENAL	% PESO CORPORAL	PA MESENTÉRICA	% PESO CORPORAL
JNA (6)	281,5 ± 20,4	1,83 ± 0,44	0,62 ± 0,13	3,47 ± 0,52	1,22 ± 0,15
JNI-10 (7)	261,3 ± 9,0	1,56 ± 0,15	0,60 ± 0,06	2,98 ± 0,16	1,15 ± 0,07
JHA (7)	294,6 ± 7,95	3,59 ± 0,28*	1,21 ± 0,08*	4,20 ± 0,24	1,42 ± 0,05
JHI-10 (7)	279,9 ± 4,85	2,97 ± 0,31*	1,06 ± 0,11*	4,03 ± 0,29	1,44 ± 0,10

Os valores representam a média ± EPM. Valores entre parênteses correspondem ao número de animais utilizados.

* $p < 0,05$ em comparação ao peso do pâncreo adiposo da região peri-renal e % do peso corporal dos animais normolipidêmicos. ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.3.4. *Fígado e adrenais*

O tratamento de ratos com dieta hiperlipídica durante seis semanas levou a um aumento significativo no peso do fígado, tanto dos animais que ingeriram água como daqueles tratados com infuso. A porcentagem do peso do fígado em relação ao peso corporal foi aumentada nos animais hiperlipidêmicos comparadas aos normolipidêmicos ou seja, a diferença entre animais normolipidêmicos e hiperlipidêmicos foi mantida (Tabela 13). O tratamento com infuso a 10% por 15 dias não alterou este quadro.

As adrenais direita e esquerda foram isoladas de alguns animais normolipidêmicos e hiperlipidêmicos, tratados ou não com o infuso a 10%. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa no peso das adrenais entre os grupos estudados (Tabela 14).

Tabela 13. Médias do peso corporal (g) e do fígado (g) e a porcentagem (%) em relação ao peso corporal dos ratos jovens que consumiram ração contendo 4% (JN) ou 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA.

GRUPOS	PESO CORPORAL	FÍGADO	% PESO CORPORAL
JNA (24)	292,6 ± 6,3	8,87 ± 0,24	3,03 ± 0,06
JNI-10 (16)	265,3 ± 7,0	9,32 ± 0,28	3,53 ± 0,11
JHA (15)	284,9 ± 6,4	21,29 ± 0,69*	7,51 ± 0,25*
JHI-10 (17)	283,1 ± 4,6	21,40 ± 0,69*	7,55 ± 0,20*

Os valores são expressos em médias ± EPM. Valores entre parênteses correspondem ao número de animais utilizados.

* $p < 0,05$ em comparação aos respectivos animais normolipidêmicos; ANOVA seguida de teste de Tukey.

Tabela 14. Médias do peso corporal (g), das adrenais direita (D) e esquerda (E) (mg) e a porcentagem em relação ao peso corporal dos ratos jovens que consumiram ração contendo 4% (JN) ou contendo 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajuca* Benth, em substituição à água de beber (JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA.

GRUPOS	PESO CORPORAL	ADRENAIS		% PESO CORPORAL	
		D	E	D	E
JNA (6)	281,5 ± 20,4	40,0 ± 7,0	40,0 ± 8,0	0,01 ± 0,004	0,01 ± 0,003
JNI-10 (7)	261,3 ± 9,0	30,0 ± 4,0	40,0 ± 5,0	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,003
JHA (7)	294,6 ± 7,95	50,0 ± 4,0	40,0 ± 3,0	0,02 ± 0,002	0,01 ± 0,002
JHI-10 (7)	279,9 ± 4,85	50,0 ± 5,0	50,0 ± 5,0	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,002

Os valores são expressos em médias ± EPM. Valores entre parênteses correspondem ao número de animais utilizados; ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.3.5. *Sensibilidade aos agonistas β -adrenérgicos em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens submetidos ou não ao tratamento com infuso a 5 ou a 10% obtido das cascas de Croton cajucara Benth durante 15 dias em substituição à água de beber*

A administração da dieta com alto teor de lipídio a ratos durante 6 semanas diminuiu significativamente a lipólise basal de adipócitos isolados destes animais. O tratamento com o infuso a 5 ou a 10% não alterou a lipólise basal dos adipócitos isolados dos animais hiperlipidêmicos ou normolipidêmicos (Tabela 15). Os efeitos das duas concentrações de infuso estão apresentados separadamente para facilitar a comparação com ratos adultos nos quais apenas a concentração de 5% foi usada.

Tabela 15. Liberação basal de glicerol de adipócitos epididimais isolados dos ratos jovens que consumiram ração contendo 4% (JN) ou contendo 15% de lipídio (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 5 ou a 10% obtido das cascas de *C. cajúcara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-5, JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA-5, JNA-10 e JHA-10.

GRUPOS	LIBERAÇÃO BASAL DE GLICEROL ^a
JNA-5 (4)	0,32 ± 0,09
JNA-10 (12)	0,47 ± 0,07
JNI-5 (4)	0,40 ± 0,09
JNI-10 (13)	0,37 ± 0,03
JHA-10 (5)	0,19 ± 0,08*
JHI-10 (7)	0,23 ± 0,02*

^a Dados expressos como médias ± EPM, em μmol de glicerol liberado/60 minutos/100mg de lipídios totais.

Valores entre parênteses correspondem ao número de animais utilizados.

* $p < 0,05$ em comparação aos ratos normolipidêmicos; ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.3.5.1. Ratos jovens normolipidêmicos tratados ou não com infuso a 5%

Nos adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos, que ingeriram água ou infuso a 5%, realizamos curvas dose-resposta a agonistas na presença e ausência de antagonistas de adrenoceptores β , seletivos ou não.

Diferentemente do que observamos em animais adultos o tratamento com infuso a 5% não induziu qualquer alteração estatisticamente significativa na liberação de glicerol induzida pela isoprenalina em adipócitos isolados do pâncreo adiposo epididimal de ratos jovens. O tratamento dos adipócitos com o antagonista β_2 , ICI118551 (50 nM) não alterou a lipólise induzida pela isoprenalina (Tabela 16; Figura 5). Não houve também nenhuma alteração de sensibilidade (pD_2) à noradrenalina (Tabela 16 e Figura 6). A pré-incubação dos adipócitos com antagonista de adrenoceptor β_1 (metoprolol, 1 μ M) desviou para a direita a curva dose-resposta à noradrenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos normolipidêmicos tratados ou não com o infuso. A presença deste antagonista no meio de incubação reduziu significativamente a resposta máxima à noradrenalina em adipócitos epididimais isolados dos grupos de animais estudados.

A incubação com ICI118551 (50 nM), não alterou a lipólise induzida pela noradrenalina nem em adipócitos isolados de ratos que ingeriram água nem de ratos tratados com o infuso a 5% (Tabela 16 e Figura 6).

As respostas ao CGP12177A e ao BRL37344 não foram alteradas pelo tratamento com o infuso de *Croton cajucara* (Tabelas 16 e 17; Figuras 7 e 8 respectivamente).

A incubação dos adipócitos com propranolol, desviou para a direita a curva dose-resposta ao BRL37344 somente quando o antagonista de adrenoceptores β_1 e β_2 foi utilizado na concentração de 1 μ M. A incubação com o antagonista de adrenoceptores β_1 (metoprolol, 1 μ M), não deslocou as curvas dose-resposta ao BRL37344 em adipócitos isolados de ratos controle ou tratados com o infuso a 5% (Tabela 17; Figura 8).

Tabela 16. Sensibilidade (PD_2) e resposta lipolítica máxima (RM) para a isoprenalina, noradrenalina e CGP12177A na ausência ou na presença de antagonistas de adrenoceptores β , seletivos ou não, em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos que ingeriram água ou infuso a 5% (JNA e JNl-5, respectivamente). O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber durante 15 dias.

	JNA			JNl-5		
	PD_2^a	RM ^b	n	PD_2^a	RM ^b	n
ISOPRENALINA						
SEM ANTAGONISTA	7,91 $\pm$ 0,31	2,09 $\pm$ 0,16	4	7,93 $\pm$ 0,23	2,00 $\pm$ 0,54	4
+ IC118551 (50 nM)	7,50 $\pm$ 0,13	2,27 $\pm$ 0,08	4	8,16 $\pm$ 0,43	2,21 $\pm$ 0,71	4
NORADRENALINA						
SEM ANTAGONISTA	7,06 $\pm$ 0,04	2,04 $\pm$ 0,16	7	7,48 $\pm$ 0,06	2,22 $\pm$ 0,36	7
+ METOPROLOL (1 μ M)	6,66 $\pm$ 0,10*	1,47 $\pm$ 0,21*	4	7,19 $\pm$ 0,07*	1,73 $\pm$ 0,15*	4
+ IC118551 (50 nM)	6,54 $\pm$ 0,30	2,09 $\pm$ 0,19	4	6,73 $\pm$ 0,41	2,15 $\pm$ 0,71	4
CGP12177A	7,69 $\pm$ 0,94	0,77 $\pm$ 0,05	4	8,78 $\pm$ 0,35	0,73 $\pm$ 0,07	4

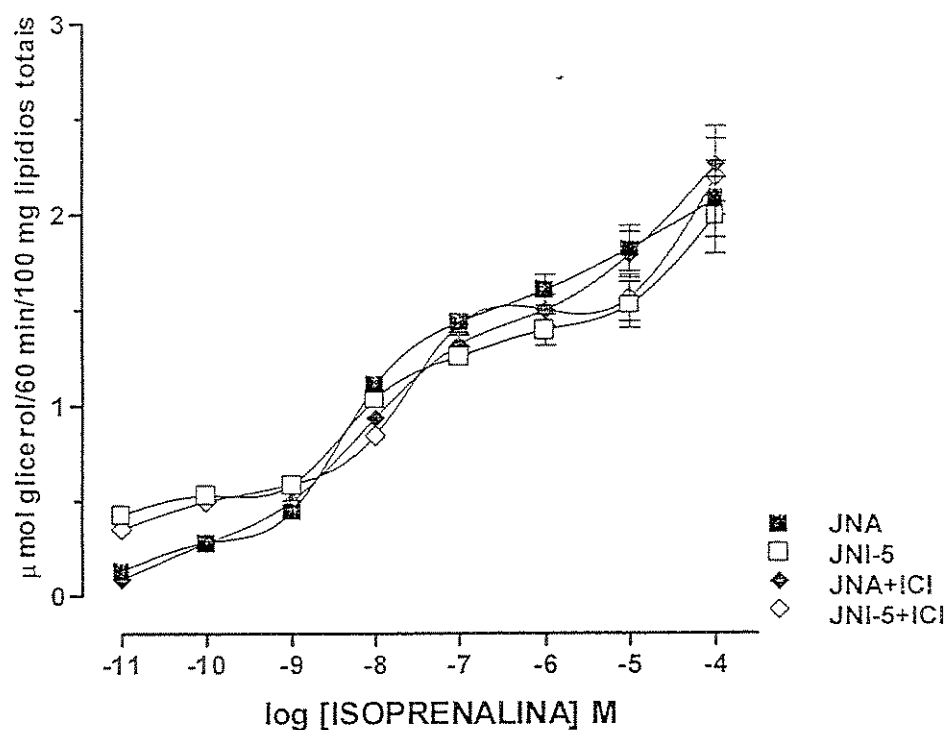
^a logaritmo negativo da concentração do agonista que induz 50% da resposta lipolítica máxima ($-\log EC_{50}$);

^b resposta máxima expressa como μ mol de glicérol liberado/60 minutos/100mg de lipídios totais.

Os valores são expressos por médias $\pm$ EPM do número de experimentos realizados em duplicatas.

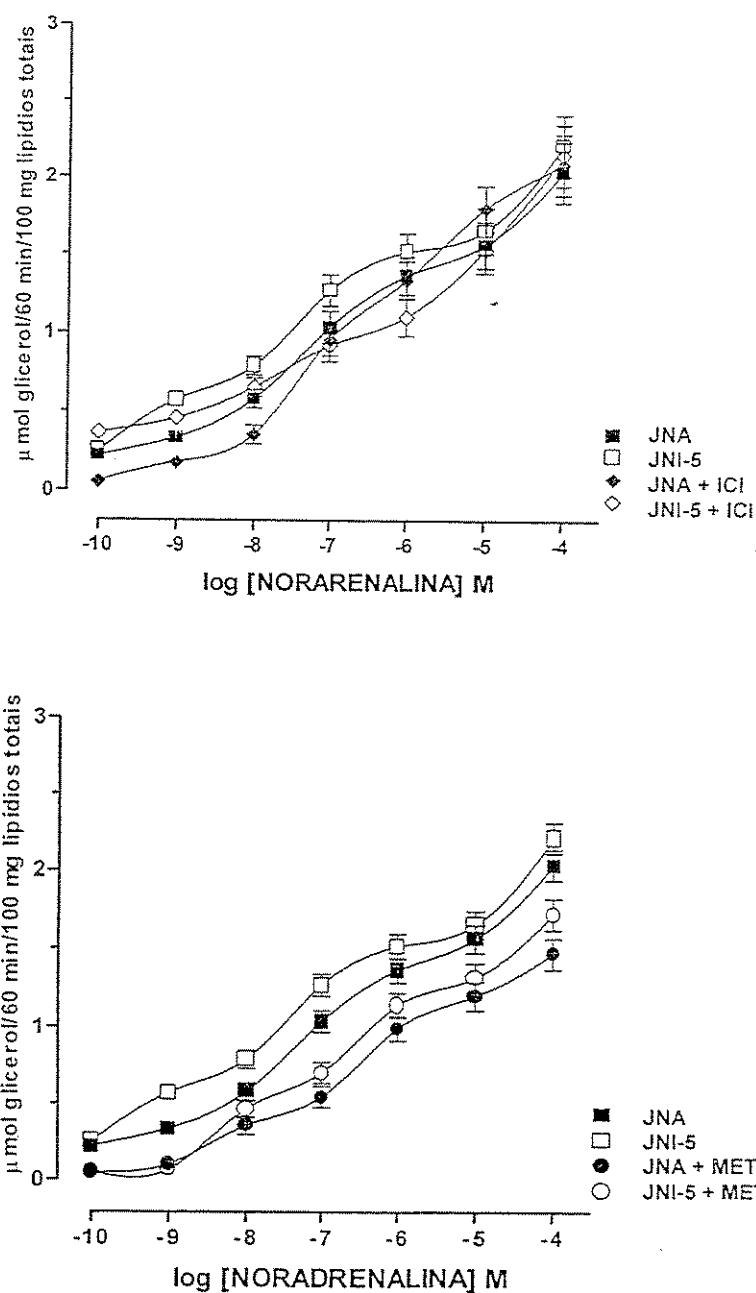
* $p < 0,05$ em comparação ao mesmo grupo sem antagonista; teste t de Student

Figura 5. Curvas dose-resposta à isoprenalina na ausência e na presença do antagonista ICI118551 (50 nM, ICI) em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens tratados (JNI-5) ou não (JNA) com infuso a 5% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



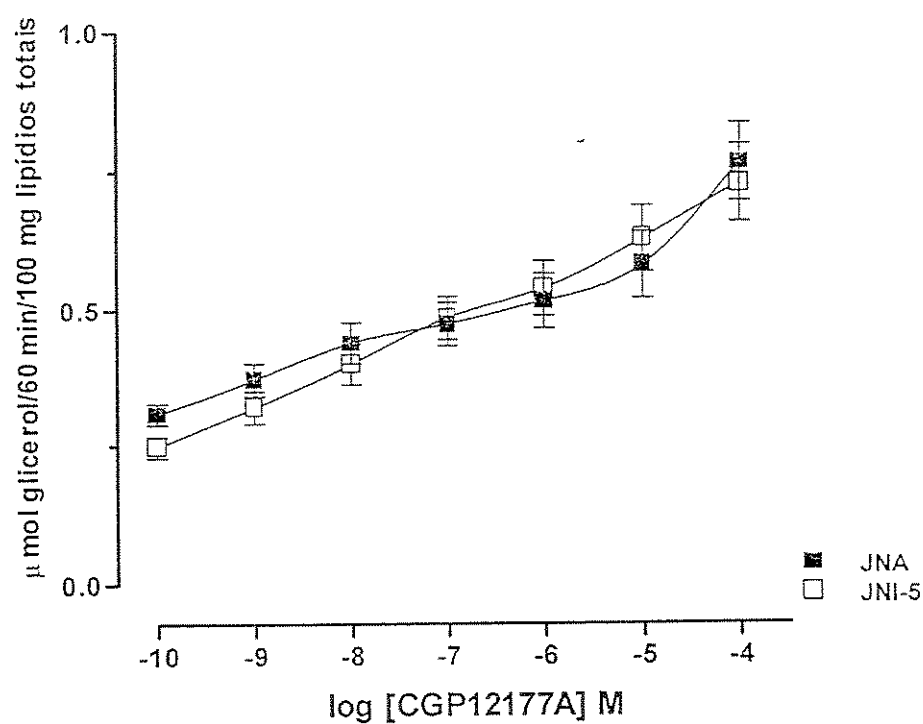
Os pontos são médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. O número de experimentos e a análise estatística estão na Tabela 16

Figura 6. Curvas dose-resposta à noradrenalina na ausência e na presença dos antagonistas ICI118551 (50nM, ICI) ou metoprolol (1 μ M, MET) em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens tratados (JNI-5) ou não (JNA) com infuso a 5% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



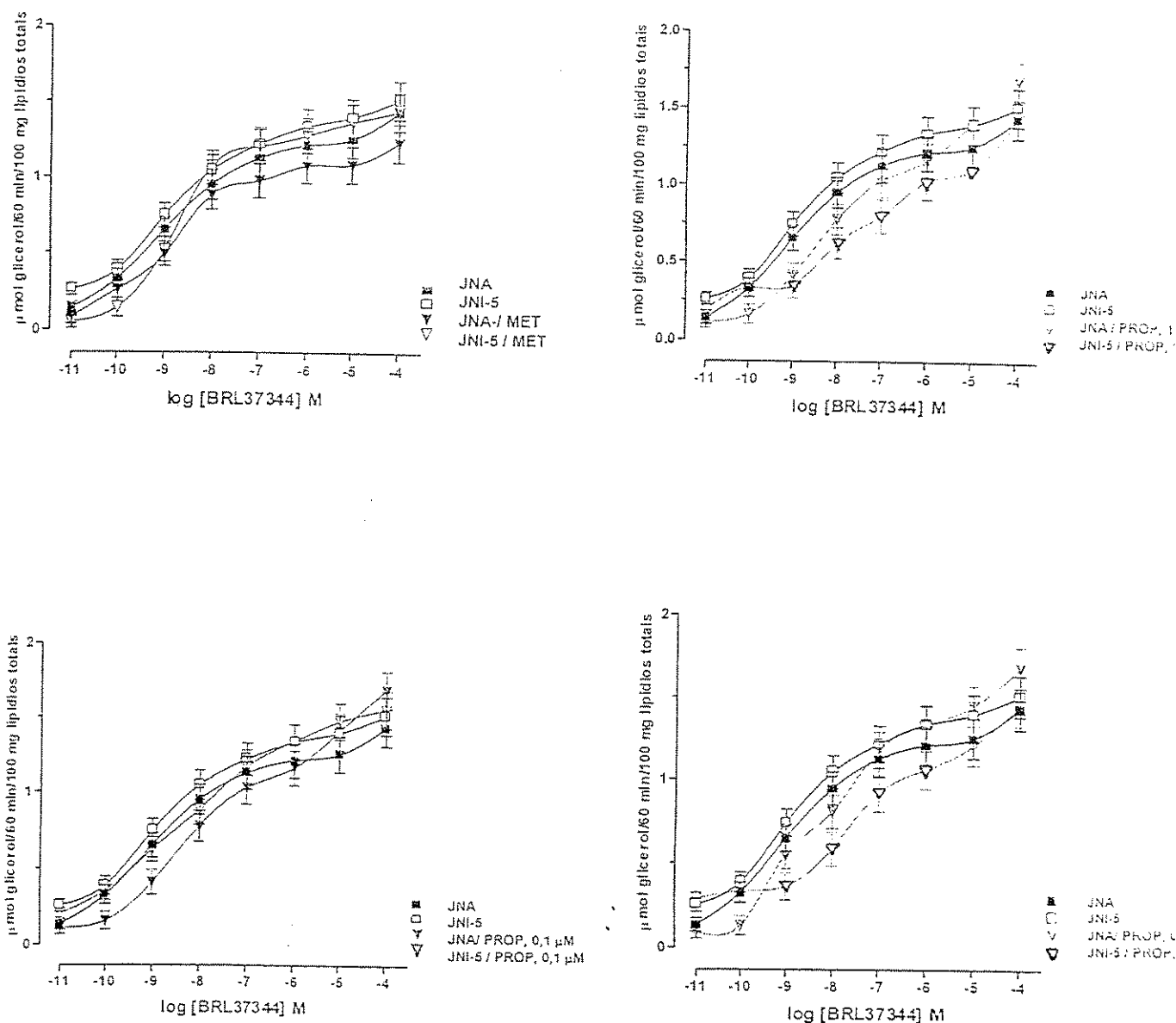
Os pontos são médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. O número de experimentos e a análise estatística estão na Tabela 16.

Figura 7. Curvas dose-resposta ao CGP12117A em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens tratados (JNI-5) ou não (JNA) com infuso a 5% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



Os pontos são médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. O número de experimentos e a análise estatística estão na Tabela 16.

Figura 8. Curvas dose-resposta ao BRL37344 na ausência e na presença dos antagonistas de β -adrenoceptores metoprolol (1 μ M, MET) ou propranolol (0,01; 0,1; 1 μ M; PROP) em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens tratados (JNI-5) ou não (JNA) com infuso a 5% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



Os pontos são médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. O número de experimentos e a análise estatística estão na Tabela 17.

4.3.5.2. Ratos jovens normolipidêmicos ou hiperlipidêmicos tratados ou não com infuso a 10%.

As curvas dose-resposta aos agonistas β -adrenérgicos, seletivos ou não, obtidas em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos, tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% estão descritas abaixo e os resultados estão apresentados nas Tabela 18 e 19; Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14. Além disso, analisamos o efeito anti-lipolítico da insulina, através da indução de lipólise máxima pela noradrenalina (1 μ M) e co-incubação com concentrações crescentes de insulina (1, 5, 10, 100 ou 500 μ U/ml) nos adipócitos epididimais isolados de animais hiperlipidêmicos ou normolipidêmicos que ingeriram água (Figura 15).

Os adipócitos isolados de ratos que consumiram ração com alto teor de lipídios apresentaram um aumento significativo na sensibilidade (pD_2) à isoprenalina e diminuição na resposta máxima, quando comparados aos adipócitos de ratos normolipidêmicos. O tratamento com infuso a 10% não induziu qualquer efeito significativo em animais normolipidêmicos ou hiperlipidêmicos (Tabela 18; Figura 9).

Não houve alteração de sensibilidade (pD_2) à noradrenalina em adipócitos isolados de ratos hiperlipidêmicos, mas a resposta máxima foi significativamente reduzida quando comparadas àquela obtida em adipócitos de ratos normolipidêmicos. O tratamento com infuso a 10% não induziu qualquer alteração no efeito da dieta (Tabela 18; Figura 10).

A administração da dieta hiperlipídica durante seis semanas levou a um aumento significativo na sensibilidade dos adipócitos epididimais à adrenalina sem, induzir qualquer alteração na resposta máxima a este agonista. O tratamento com infuso não alterou os efeitos da dieta (Tabela 18; Figura 11). Por outro lado, o tratamento de ratos normolipídicos com infuso a 10% levou a um aumento na sensibilidade e na resposta máxima à adrenalina em adipócitos isolados, quando comparados àquela obtida em adipócitos de ratos normolipidêmicos que ingeriram água (Tabela 18; Figura 11).

Tabela 18. Sensibilidade (pD_2) e resposta lipolítica máxima (RM) à isoprenalina, noradrenalina e adrenalina, obtidas de adipócitos epididimais isolados de ratos jovens que consumiram ração com 4% (JN) ou 15% de lipídios (JH) por seis semanas. Nas últimas duas semanas, ratos normo e hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA.

GRUPO	pD_2^a	RM ^b
ISOPRENALINA		
JNA (14)	$6,75 \pm 0,11$	$2,85 \pm 0,32$
JNI-10 (14)	$6,72 \pm 0,12$	$3,66 \pm 0,42$
JHA (8)	$7,27 \pm 0,23^*$	$1,78 \pm 0,45^{**}$
JHI-10 (10)	$7,19 \pm 0,14^*$	$1,94 \pm 0,30^{**}$
NORADRENALINA		
JNA (14)	$6,32 \pm 0,13$	$3,28 \pm 0,33$
JNI-10 (14)	$6,39 \pm 0,13$	$3,95 \pm 0,37$
JHA (7)	$6,45 \pm 0,26$	$2,08 \pm 0,29^{**}$
JHI-10 (10)	$6,96 \pm 0,18$	$2,55 \pm 0,24^{**}$
ADRENALINA		
JNA (7)	$5,68 \pm 0,12$	$2,36 \pm 0,31$
JNI-10 (11)	$6,30 \pm 0,15^*$	$3,61 \pm 0,44^{\#}$
JHA (6)	$6,90 \pm 0,23^*$	$1,98 \pm 0,16$
JHI-10 (7)	$6,15 \pm 0,43$	$2,26 \pm 0,34$

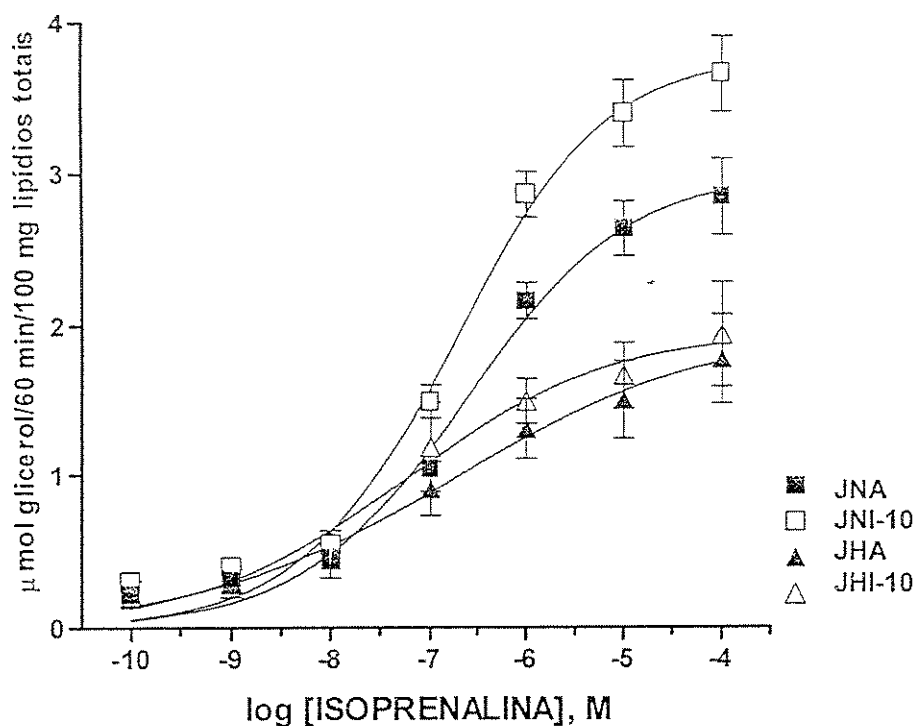
^a logarítmo negativo da concentração do agonista que induz 50% da resposta lipolítica máxima (-log EC_{50});

^b resposta máxima expressa como μmol de glicerol liberado/60 minutos/100mg de lipídios totais.

Valores são expressos por médias $\pm$ EPM do número de experimentos realizados, valores entre parênteses.

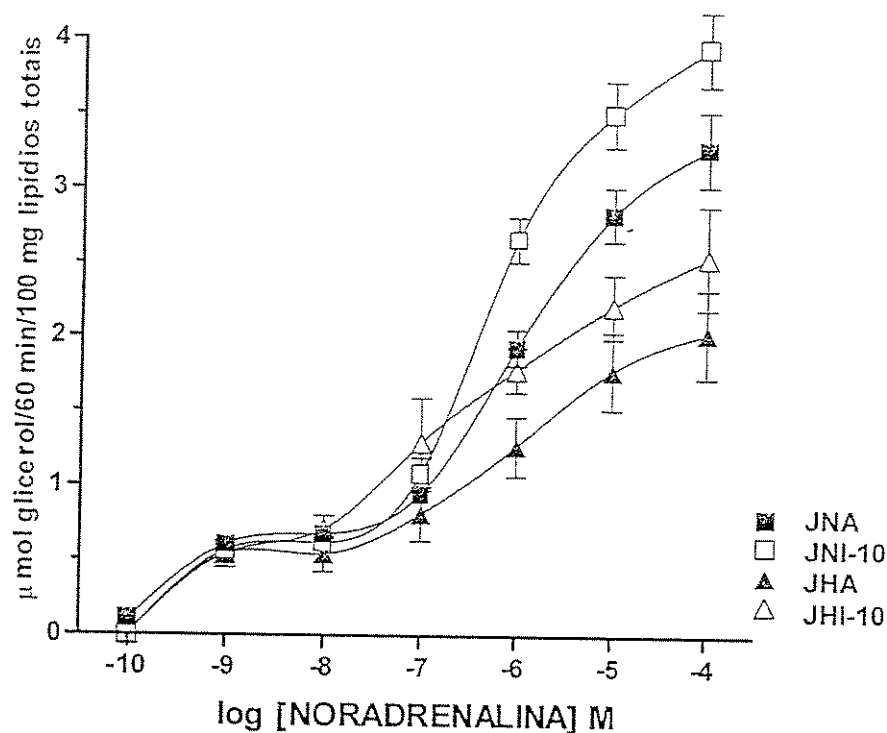
* $p < 0,05$ em comparação a pD_2 dos animais normolipidêmicos água (JNA); ** $p < 0,05$ em comparação a RM dos animais normolipidêmicos (JNA; JNI-10); # $p < 0,05$ em comparação aos animais JNA, JHA e JHI-10; ANOVA seguida de Tukey.

Figura 9. Curvas dose-resposta à isoprenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



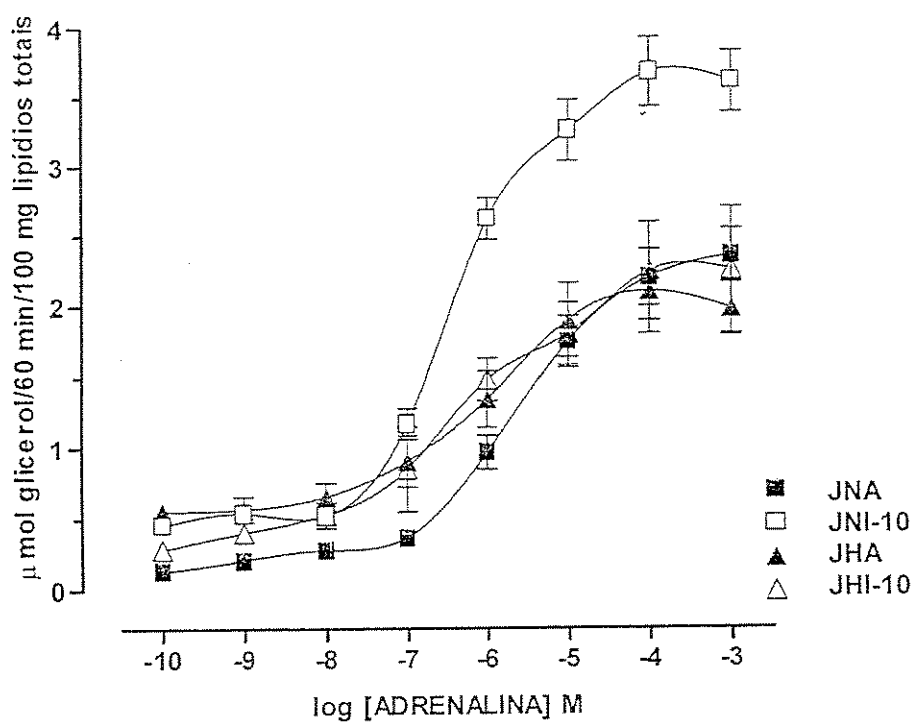
Os pontos são médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. O número de experimentos e a análise estatística estão na Tabela 18.

Figura 10. Curvas dose-resposta à noradrenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



Os pontos são médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. O número de experimentos e a análise estatística estão na Tabela 18.

Figura 11. Curvas dose-resposta à adrenalina em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



Os pontos são as médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. O número de experimentos e a análise estatística estão na Tabela 18.

Curvas dose-resposta obtidas em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos, que ingeriram água ou infuso a 10%, não apresentaram alterações de sensibilidade (pD_2) ao BRL37344. Porém, animais hiperlipidêmicos (JHA e JHI-10) apresentaram resposta máxima diminuída quando comparada àquela obtida em adipócitos de ratos normolipidêmicos que ingeriram infuso a 10% (Tabela 19; Figura 12).

Curvas dose-resposta ao CGP12117A, obtidas dos adipócitos epididimais isolados de animais jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos, que ingeriram água ou infuso a 10%, não apresentaram alterações de sensibilidade (pD_2), bem como de resposta máxima (Tabela 19; Figura 13).

A sensibilidade dos adipócitos epididimais isolados ao salbutamol, não foi diferente entre os grupos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos jovens, que ingeriram água ou infuso a 10%. Porém, o tratamento com o infuso a 10% aos animais normolipidêmicos levou a um aumento significativo na resposta máxima a este agonista em adipócitos isolados, quando comparada àquelas obtidas a partir dos animais normolipidêmicos (Tabela 19; Figura 14).

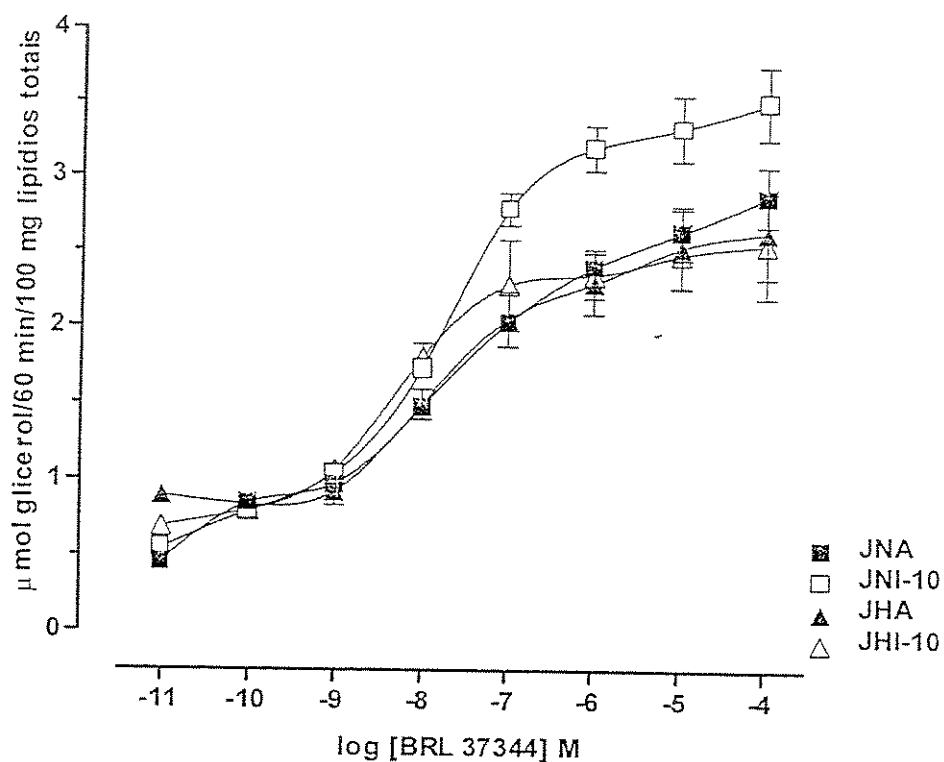
Nossos resultados demonstram que o tratamento com o infuso a 10% ou a indução da hiperlipidemia não alteraram a resposta ao dibutilil-AMPc, indicando que as etapas pós-receptor estão preservadas (Tabela 19).

Tabela 19. Sensibilidade (pD_2) e resposta lipolítica máxima (RM) ao salbutamol, CGP12177A e BRL37344, obtidas em adipócitos epididimais isolados dos ratos jovens que ingeriram ração contendo 4% (JN) ou 15% de lipídios (JH) durante seis semanas. Nas últimas duas semanas, tanto os ratos normo como hiperlipidêmicos receberam infuso a 10% obtido das cascas de *C. cajucara* Benth, em substituição à água de beber (JNI-10 e JHI-10). Os ratos que permaneceram ingerindo água foram designados como JNA e JHA.

GRUPO	pD_2^a	RM ^b
BRL37344		
JNA (8)	$8,06 \pm 0,18$	$2,88 \pm 0,53$
JNI-10 (8)	$8,18 \pm 0,18$	$3,51 \pm 0,44$
JHA (5)	$8,61 \pm 0,45$	$2,64 \pm 0,44^*$
JHI-10 (5)	$9,11 \pm 0,25$	$1,56 \pm 0,27^*$
CGP12177A		
JNA (9)	$7,98 \pm 0,36$	$1,44 \pm 0,19$
JNI-10 (13)	$7,32 \pm 0,40$	$1,67 \pm 0,20$
SALBUTAMOL		
JNA (7)	$5,67 \pm 0,62$	$1,61 \pm 0,33$
JNI-10 (11)	$5,90 \pm 0,36$	$3,48 \pm 0,67^{**}$
JHA (5)	$6,39 \pm 0,74$	$1,83 \pm 0,29$
JHI-10 (7)	$6,56 \pm 0,65$	$1,82 \pm 0,33$
dibutiril AMPc (3μM)		
JNA (10)		$1,43 \pm 0,20$
JNI-10 (10)		$1,82 \pm 0,20$
JHA (4)		$1,54 \pm 0,21$
JHI-10 (6)		$1,77 \pm 0,21$

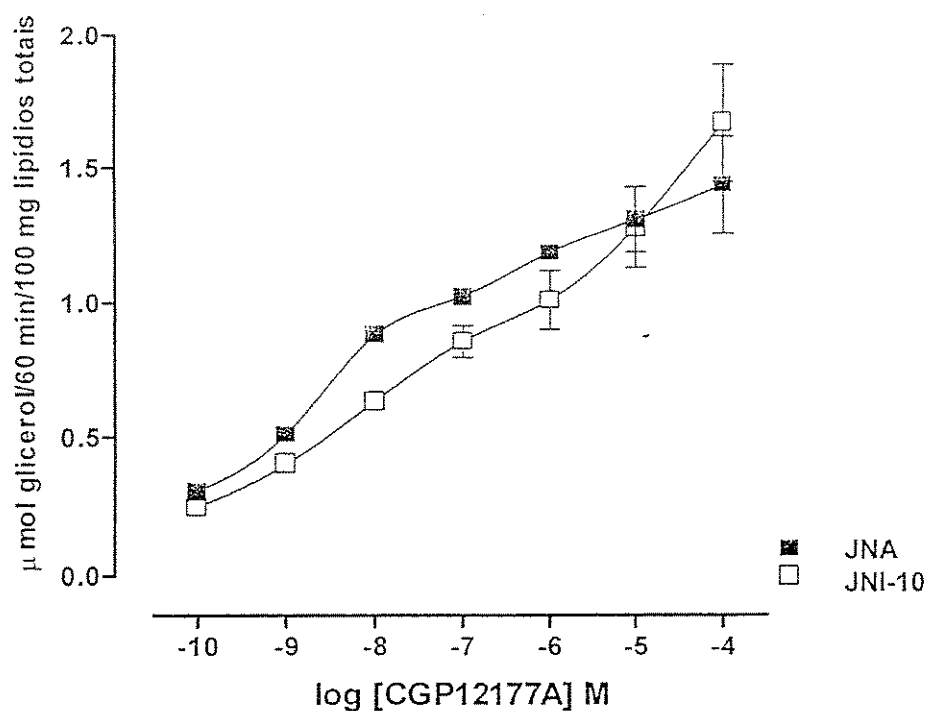
^a logarítmo negativo da concentração do agonista que induz 50% da resposta lipolítica máxima (-log EC₅₀); ^b resposta máxima expressa como μ mol de glicerol liberado/60 minutos/100mg de lipídios totais. Os valores são expressos por médias $\pm$ EPM do número de experimentos realizados. * $p < 0,05$ em comparação aos animais do grupo JNI-10; ** $p < 0,05$ em comparação aos animais dos grupos JNA, JHA e JHI-10; ANOVA seguida de Tukey.

Figura 12. Curvas dose-resposta ao BRL37344 obtidas em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



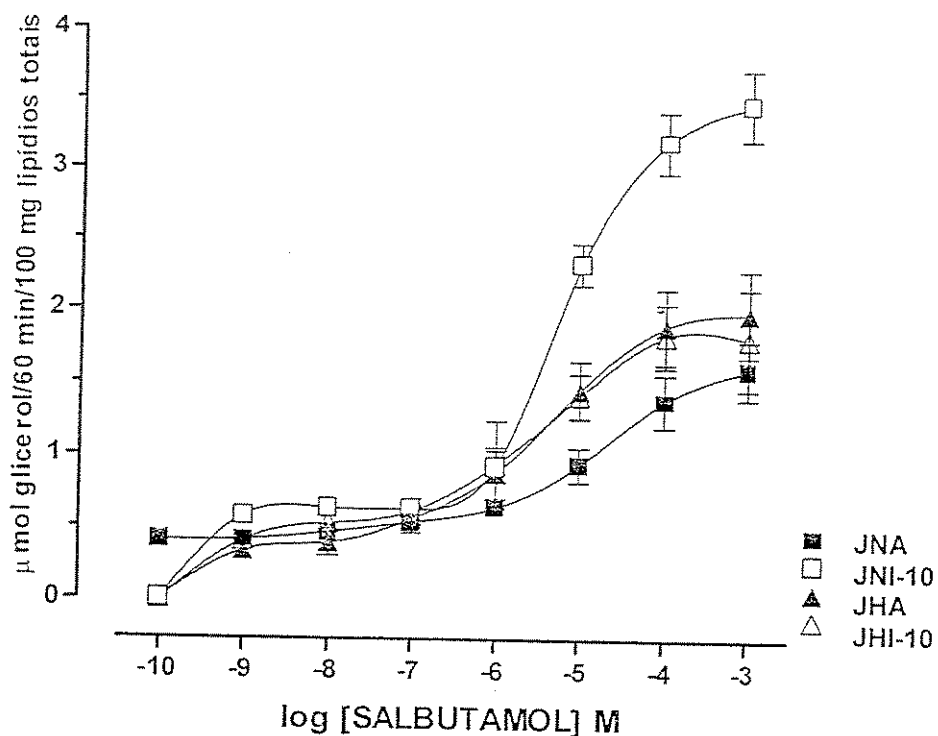
Os pontos são as médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. O número de experimentos e a análise estatística estão na Tabela 19.

Figura 13. Curvas dose-resposta ao CGP12177A obtidas em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos tratados (JNI-10) ou não (JNA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



Os pontos são as médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. O número de experimentos e a análise estatística estão na Tabela 19.

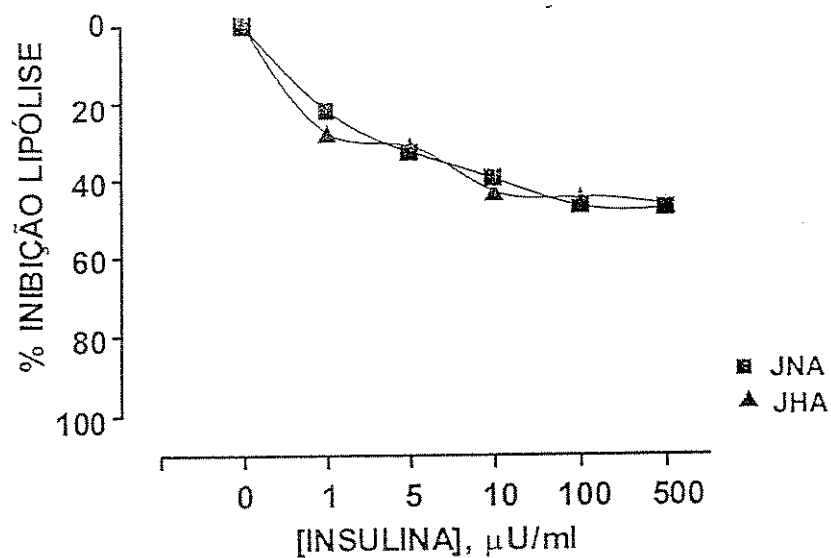
Figura 14. Curvas dose-resposta ao salbutamol em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados (JNI-10 e JHI-10) ou não (JNA e JHA) com infuso a 10% obtidos das cascas de *Croton cajucara* Benth. O infuso foi oferecido aos animais em substituição à água de beber.



Os pontos são as médias $\pm$ EPM de experimentos realizados em duplicata. O número de experimentos e a análise estatística estão na Tabela 19.

Adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos apresentaram semelhante inibição da lipólise induzida pela insulina. Esta inibição variou de 21% quando a concentração de 1 $\mu\text{U/ml}$ de insulina foi utilizada e cerca de 47% quando utilizamos 500 $\mu\text{U/ml}$ de insulina (JNA: $47,5 \pm 3,0\%$, $n=4$ e JHA: $46,62 \pm 4,3\%$, $n=6$; $p > 0,05$, Figura 15).

Figura 15. Inibição da lipólise induzida pela insulina em adipócitos epididimais isolados de ratos jovens normolipidêmicos (JNA) e hiperlipidêmicos (JHA).



Os pontos representam as médias de experimentos realizados em duplicata.

4.3.6 Análise histológica do fígado de ratos jovens normolipidêmicos e hiperlipidêmicos tratados ou não com infuso a 10% de Croton cajucara Benth.

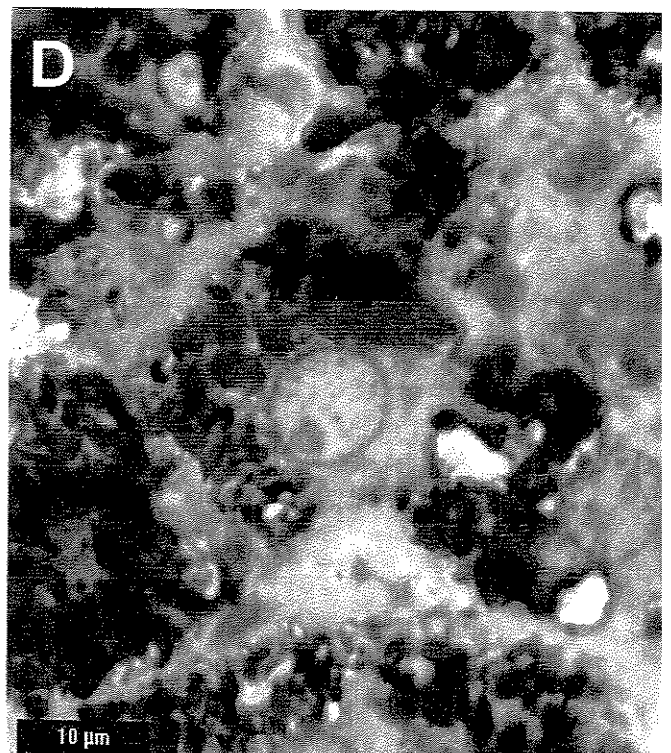
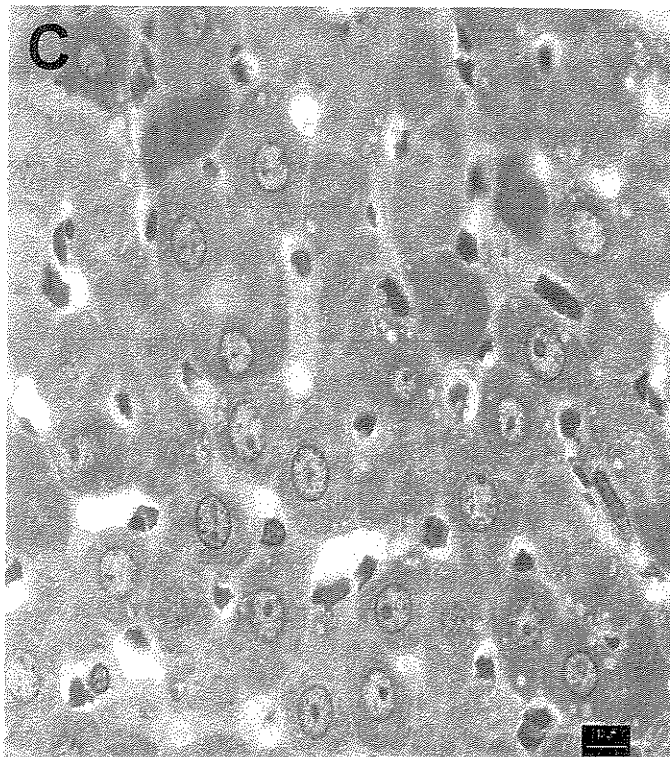
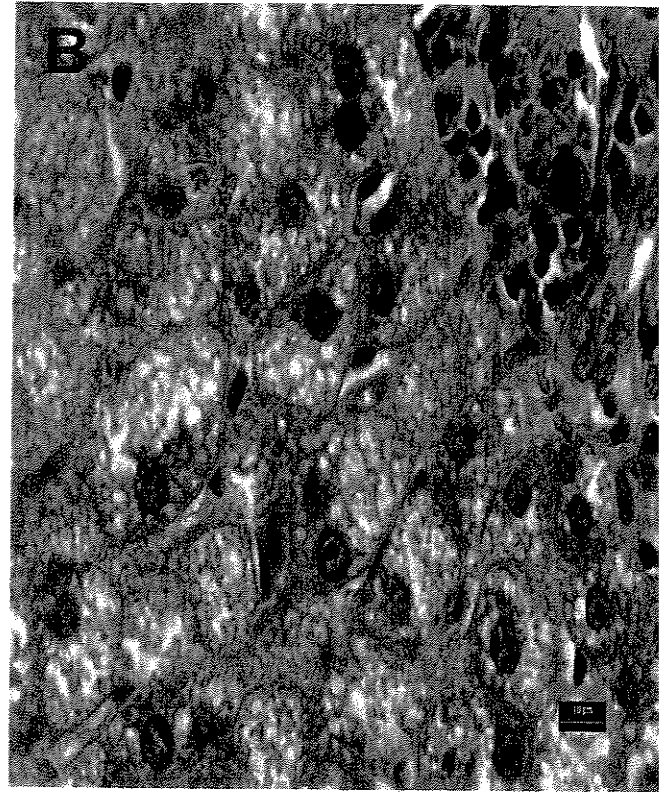
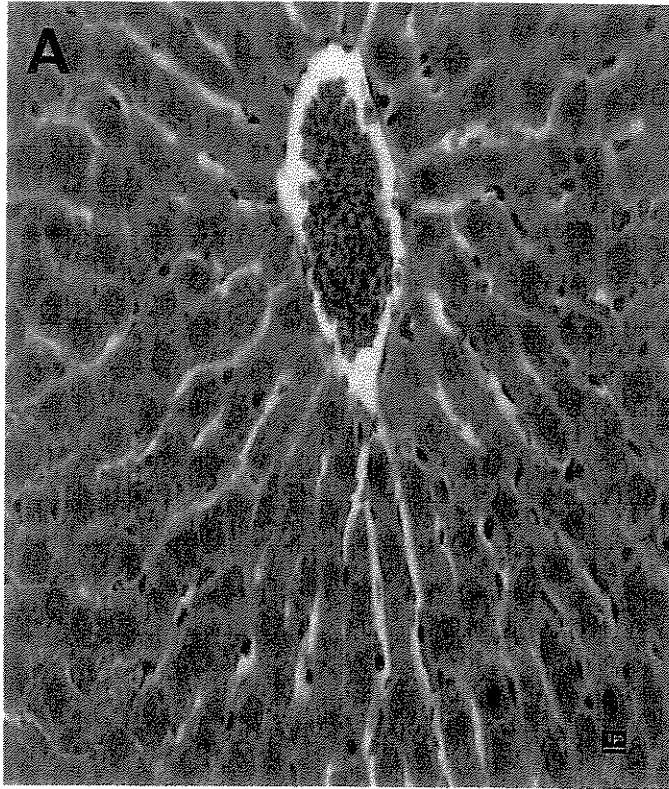
Nossos resultados mostraram que os ratos que consumiram dieta com alto teor de lipídio por 4 ou 6 semanas apresentaram hepatomegalia, caracterizada por aumento no tamanho e no peso do fígado. Além disso, estes animais apresentavam fígado com aspecto alterado quando comparado com aquele observado entre os ratos normolipidêmicos de mesma idade. O fígado dos ratos hiperlipidêmicos apresentou coloração esbranquiçada com pontos escuros em toda a extensão, além de consistência diferente daquela observada no grupo normolipidêmico.

A partir destas observações iniciamos investigação histológica do fígado, por meio da obtenção de cortes, corados com hematoxilina e eosina (HE), analisados por microscopia óptica.

Os resultados das análises histológicas diagnosticaram esteatose hepática nos ratos que consumiram dieta com alto teor de lipídio. Este quadro patológico é observado a partir da 10ª semana de idade (após 4 semanas de consumo da ração), onde observamos vacuolização do citoplasma devida ao depósito de lipídios. Esses depósitos lipídicos não são corados por coloração HE, mas a coloração com Sudan Black B confirmou a deposição de lipídios no citoplasma dos hepatócitos desses animais. Após mais duas semanas de consumo desta ração, o quadro de esteatose hepática se manteve. Além disso, observamos pontos de necrose no tecido hepático de alguns animais hiperlipidêmicos (Figura 16). O tratamento com o infuso a 10% não alterou este quadro, dados não mostrados.

Figura 16. Fotomicrografia de hepatócitos de ratos que ingeriram dieta padrão (A e C) ou dieta contendo 15 % de lipídios (B e D) durante seis semanas. Em A e B foram usadas hematoxilina e eosina enquanto em C e D foi usado Sudan Black B.

Barras= 10 μ m



5. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que o efeito do tratamento com o infuso a 5% variou com a faixa etária dos animais.

Ratos adultos normolipidêmicos que receberam o tratamento durante 15 dias com o infuso a 5% das cascas de *Croton cajucara* Benth em substituição à água de beber não apresentaram significativo ganho de peso quando comparados aos animais controle. Os ratos do grupo tratado não apresentaram diferenças na quantidade de alimento ou líquido ingeridos. Estes resultados mostram que o infuso evitou o ganho de peso, mesmo que a ingestão de alimento não tenha sido reduzida. Além disto, a taxa de lipólise basal não foi modificada em adipócitos de ratos que ingeriram o infuso e não houve alteração no peso do pâncreas adiposo epididimal. Isto sugere que o tratamento está alterando, de alguma forma, a absorção de alimento ou o metabolismo de gordura.

Sendo o adipócito a unidade funcional do tecido adiposo, estudos em adipócitos isolados podem elucidar alguns dos mecanismos que regulam o metabolismo de gordura. Nossos resultados mostraram que a sensibilidade à isoprenalina e à adrenalina foi significativamente maior em adipócitos isolados de ratos tratados quando comparados com os adipócitos dos ratos controle. Como a isoprenalina e a adrenalina são agonistas β -adrenérgicos não seletivos, estes resultados sugerem uma alteração no número de adrenoceptores ou na afinidade aos agonistas ou, ainda, alguma alteração em etapas intracelulares posteriores à ativação dos adrenoceptores pelo agonista, induzida pelo tratamento de ratos com infuso de *Croton cajucara*.

Nenhuma alteração foi observada na sensibilidade ou resposta máxima à noradrenalina ou BRL37344 em adipócitos de ratos que receberam o infuso. Estes resultados, em conjunto, indicam que em adipócitos de ratos tratados com o infuso, ocorre um aumento na resposta mediada pelo subtipo β_2 - de adrenoceptor, sem alteração nas respostas mediadas pelos adrenoceptores β_1 ou β_3 , modificando assim a proporção dos subtipos de adrenoceptores nos adipócitos.

Esta hipótese foi confirmada pelo efeito dos antagonistas nas respostas aos agonistas. Em adipócitos de ratos controle, o metoprolol, um antagonista seletivo de adrenoceptor β_1 , deslocou as curvas dose-resposta à isoprenalina e à noradrenalina para a direita, não apresentando efeito nas respostas máximas ou lipólise basal. Porém, em adipócitos isolados de ratos tratados, a curva dose-resposta à isoprenalina não foi modificada pelo metoprolol. Este efeito está de acordo com a sugestão de que em adipócitos de ratos tratados o bloqueio de adrenoceptores do subtipo β_1 pelo metoprolol foi compensado por outro subtipo de adrenoceptor β , não bloqueado pelo antagonista porém ativado pela isoprenalina.

O deslocamento para a direita, induzido pelo antagonista em curva dose-resposta à noradrenalina, foi menor que aquele na curva dose-resposta à isoprenalina. Além disto, a supersensibilidade à isoprenalina, observada em adipócitos de ratos tratados, foi abolida pelo antagonista seletivo de adrenoceptor β_2 , o IC118551, enquanto que a resposta lipolítica mediada pela noradrenalina não foi modificada pelo mesmo antagonista. Em adipócitos de ratos controle, IC118551 não apresentou nenhum efeito nas curvas dose-resposta à isoprenalina e à noradrenalina. Estes dados estão de acordo com o fato de que em ratos controle, o subtipo β_2 de adrenoceptor é de menor importância quando comparado com os subtipos β_1 e β_3 (GERMACK *et al.*, 1997).

A supersensibilidade a agonistas não seletivos mediada por adrenoceptores β_2 pode ser resultado de aumento no número dos adrenoceptores β_2 na membrana do adipócito (FARIAS-SILVA *et al.*, 1999; idem 2003), alteração na afinidade do receptor para os agonistas ou ligação mais eficiente entre este subtipo de adrenoceptor β e efetores intracelulares (LANGIN *et al.*, 1996). Nós não investigamos os mecanismos envolvidos com este efeito. Independentemente do mecanismo, um aumento na população de adrenoceptores β_2 poderia aumentar a importância da adrenalina como estimulador endógeno da lipólise. Este poderia resultar em uma aumentada lipólise e perda de peso, em ratos adultos, mesmo que a ingestão de alimento não tenha sido reduzida. Não foi demonstrado se este efeito ocorre *in vivo* e sua relação, se existe, com um peso corpóreo estável durante o período que os ratos ingeriram o infuso de *Croton cajucara*.

O tratamento de ratos adultos com o infuso a 5% levou a uma redução significativa nas concentrações plasmáticas de glicose e de colesterol total, sem qualquer alteração nas concentrações de triacilgliceróis.

Nos mamíferos, o controle da glicemia é mantido em faixa bastante estreita já que a glicose é a única fonte de energia para o cérebro. Basicamente, o controle é estabelecido da seguinte forma:

- quando há um aumento na concentração plasmática de glicose ocorre estímulo para a secreção de insulina que, por sua vez, aumenta a absorção de glicose pelas células, retornando assim a glicemia para valores normais;

- quando ocorre diminuição nas concentrações plasmáticas de glicose, a secreção de glucagon é ativada. Este estimula a glicogenólise, normalizando assim a glicemia.

Além da secreção de glucagon, a hipoglicemia tem um efeito estimulador direto sobre o hipotálamo, excitando o sistema nervoso simpático. Esta estimulação, por sua vez, promove a liberação de adrenalina e noradrenalina da medula supra-renal, assim como a liberação de noradrenalina pelas terminações nervosas simpáticas. A adrenalina e em menor grau, a noradrenalina, possuem efeito semelhante ao glucagon, promovendo glicogenólise hepática. Este, por sua vez, promove rápida liberação de glicose para o sangue circulante, retornando assim, a normoglicemia (HEMS & WHITTON, 1980).

De acordo com resultados previamente descritos, os ratos adultos tratados com infuso a 5% apresentaram redução na glicemia (GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1998). Como, os ratos que utilizamos não foram previamente tornados diabéticos com qualquer medicação, supusemos que antes do início do tratamento nossos ratos apresentavam normoglicemia e normoinsulinemia. Nesta condição, o controle da glicemia é principalmente estabelecido pela quantidade de glicose estocada. O mecanismo de ação de medicamentos hipoglicemiantes orais se baseia na estimulação da secreção de insulina (p.ex. sulfoniluréias) ou através do aumento na captação basal de glicose através da membrana celular das células musculares esqueléticas (biguamidas; GERICH, 1989).

Estudos anteriores de tolerância à glicose em ratos adultos que receberam o infuso a 5% demonstraram que, mesmo sendo a glicemia inicial significativamente menor que a dos ratos controle (tempo 5 min antes da administração da glicose), durante o teste os ratos tratados apresentaram valores glicêmicos significativamente menores que aqueles dos ratos controle, sugerindo aumento na velocidade/eficácia de captura da glicose pelas células, para estocagem. Isto nos levou ao estudo da quantidade de glicogênio estocada em tecidos hepático e muscular. Os resultados destes estudos demonstraram que houve aumento significativo na quantidade de glicogênio estocada em tecidos hepático e muscular esquelético, não sendo apresentada nenhuma alteração no tecido muscular cardíaco (ventrículo). Estes resultados confirmam que a diminuição da glicemia, apresentada pelos ratos tratados, se deve a uma maior facilitação da captura da glicose pelos tecidos hepático e muscular esquelético (GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1998). Os mecanismos envolvidos com este efeito provavelmente não se correlacionam a alterações na insulinemia já que a entrada de glicose nos hepatócitos ocorre por mecanismos independentes deste hormônio.

Embora não existam relatos na literatura utilizando o infuso preparado a partir da sacaca, Farias *et al.* (1997) demonstraram que a trans-desidrocrotonina (*t*-DHC), substância isolada desta planta, apresentou significativo efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos por administração de aloxana. Este grupo também relata redução da glicemia em ratos normais alimentados (glicemia controle: $92,33 \pm 6,94$ mg/dl e tratado: $76,43 \pm 5,24$ mg/dl). Silva *et al.* (2001b) também relataram efeito hipoglicemiante da *t*-DHC, quando administrada a ratos onde a diabetes foi induzida pela estreptozotocina, sem apresentarem relatos em ratos controle. Ambos trabalhos relatam o efeito hipoglicemiante em situação onde as ilhotas pancreáticas foram destruídas inferindo, então, que o mecanismo envolvido não está relacionado à presença de insulina.

A redução nas concentrações plasmáticas de colesterol total, em animais hipercolesterolêmicos, é fato bastante relatado em experimentos relacionados com a planta sacaca. A literatura apresenta resultados positivos provenientes do infuso a 5% oferecido a coelhos onde a hipercolesterolemia foi

induzida pela dieta (OLIVEIRA *et al.*, 1995), ou pela administração de extrato hidro-alcoólico obtido da sacaca a ratos alimentados com dieta rica em lipídios (FARIAS *et al.*, 1996). Além disto, estudos em que a *t*-DHC, foi administrada diariamente a camundongos alimentados com dieta rica em lipídios, mostram sua eficácia na dose de 25 mg/Kg (SILVA *et al.*, 2001a). Resultado semelhante foi observado em camundongos onde a hipercolesterolemia foi induzida pelo Triton WR 1339 (tiloxapol, SILVA *et al.*, 2001b). Nossos resultados demonstraram uma redução nas concentrações plasmáticas de colesterol total em ratos adultos normolipidêmicos. Nossos resultados não permitem identificar se ocorre redução na absorção, ou na formação de colesterol, ou aumento na sua taxa de degradação.

As biguamidas, além de diminuírem a glicemia, através do aumento na captação basal de glicose, causam diminuição nas concentrações plasmáticas de colesterol total, mais especificamente LDL e VLDL (RANG *et al.*, 1995). Estudos de captação de glicose e das frações de colesterol em ratos normolipidêmicos tratados com o infuso a 5% são necessários para o esclarecimento do efeito.

Há vários relatos positivos sobre a redução nas concentrações de triacilgliceróis em coelhos, ratos e camundongos tornados hiperlipidêmicos por diferentes substâncias ou dietas, tratados com diferentes produtos da sacaca (infuso, extrato hidro-alcoólico ou *t*-DHC; OLIVEIRA *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2001a e b). Por outro lado, Farias *et al.* (1996) relatam a ausência de efeito hipotrigliceridêmico do extrato hidro-alcoólico em ratos alimentados com dieta rica em lipídios. E, da mesma forma, não existem na literatura relatos onde o extrato ou infuso obtido da sacaca, ou mesmo a *t*-DHC tenha sido oferecida a ratos, camundongos ou coelhos normolipidêmicos. Nossos resultados demonstraram ausência de efeito sobre as concentrações sanguíneas de triacilgliceróis em ratos adultos normolipidêmicos.

Ratos jovens normolipidêmicos que receberam o infuso a 5% não apresentaram qualquer alteração nos parâmetros avaliados. Para esta população com menor faixa etária, a concentração do infuso foi, então, aumentada para 10%.

Um grupo de animais jovens hiperlipidêmicos também recebeu o tratamento com o infuso a 10%.

O tratamento com o infuso a 10% de ratos jovens normolipidêmicos, não alterou o peso corporal, ingesta alimentar ou calórica e nem o consumo líquido. O peso do tecido hepático, das adrenais e dos panículos adiposos das regiões epididimal, peri-renal ou mesentérica também não foi alterado, bem como a lipólise basal dos adipócitos isolados da região epididimal. O tratamento com o infuso a 10% levou a um aumento na sensibilidade dos adipócitos isolados da região epididimal à adrenalina, sem apresentar qualquer alteração significativa aos agonistas isoprenalina, noradrenalina, BRL37344, CGP12177A ou salbutamol. A resposta máxima destes adipócitos foi significativamente aumentada aos agonistas adrenalina e salbutamol. A resposta máxima induzida pelo dibutilil-AMPC em adipócitos não foi alterada pelo tratamento com o infuso. Estes resultados permitem concluir que o infuso, na concentração de 10%, oferecido aos animais jovens, apresentou os mesmos efeitos observados em ratos adultos tratados com infuso a 5%, ou seja, alterações na resposta lipolítica aos agonistas que atuam em adrenocetores β_2 , sem qualquer alteração nas etapas pós-receptor; porém, o efeito sobre a lipólise induzida pela adrenalina relacionado ao peso corporal total do rato, nesta faixa etária, é menos evidente do que quando comparados a ratos adultos.

As concentrações séricas de colesterol total e suas frações, de triacilgliceróis, de glicose, de insulina e de leptina, bem como o índice aterogênico de ratos jovens normolipidêmicos não foram alteradas pelo tratamento com o infuso a 10%.

A administração da dieta hiperlipídica a ratos jovens não alterou o peso corporal apesar da ingesta alimentar e calórica deste grupo de ratos apresentar-se significativamente inferior àquela apresentada pelo grupo normolipidêmico. O tratamento com o infuso a 10% acentuou significativamente a diminuição na ingesta.

A ingestão alimentar fornece ao organismo o aporte calórico necessário, juntamente com micronutrientes (vitaminas e sais minerais) e

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

Além disto, um grande número de neuropeptídeos está envolvido no controle que o sistema nervoso central exerce sobre a ingestão alimentar e o balanço energético, tais como neuropeptídeo Y, hormônio liberador de corticotropina, somatostatina, entre outros. Entretanto, a leptina, um hormônio sintetizado e secretado pelos adipócitos relacionado à quantidade de lipídio estocado, participa ativamente no sistema regulatório do controle da ingestão (FRIEDMAN *et al.*, 1985; PELLEYMOUNTER *et al.*, 1995; MAFFEI *et al.*, 1995; FRIEDMAN & HALAAS, 1998; AINSLIE *et al.*, 2000). Os ratos hiperlipidêmicos, mesmo apresentando aumento significativo no peso de pâncreo adiposo das regiões epididimal e peri-renal, não apresentaram qualquer alteração na concentração circulante de leptina. Estes dados estão de acordo com Haluzík *et al.* (2000), que demonstraram não existir diferença entre as concentrações séricas de leptina de indivíduos hiperlipidêmicos e saudáveis.

A administração da dieta hiperlipídica induziu aumento significativo no peso dos pâncreos adiposos das regiões epididimal e peri-renal; o tratamento com o infuso a 10% não alterou este quadro. Sabemos que o aumento no peso do tecido adiposo está relacionado tanto a um aumento no volume dos adipócitos como no número; o estímulo para ocorrer um aumento no número está relacionado ao aumento no tamanho do adipócito (BJORNTORP *et al.*, 1982). O aumento no tamanho do adipócito, por sua vez, está diretamente relacionado ao estoque de triacilgliceróis nos adipócitos (ECKEL, 1989). Este estoque de

triacilgliceróis em adipócitos resulta principalmente do balanço entre a incorporação de ácidos graxos livres, liberados pela hidrólise de triacilgliceróis circulantes pela enzima lipoproteína lipase nos capilares do tecido adiposo (TASKINEN, 1987; ECKEL, 1989; OLIVECRONA *et al.*, 1991), e lipólise dos triacilgliceróis estocados, estimulada pela enzima lipase sensível a hormônio, em ácidos graxos livres e glicerol (LARGE & ARNER, 1998). Estes processos regulam o tamanho do adipócito e são reciprocamente regulados, sugerindo relação inversa entre atividade da lipoproteína lipase do tecido adiposo e lipase sensível a hormônio (PATTEN, 1970).

A lipoproteína lipase foi relacionada à patogênese das dislipidemias, principalmente em situações associadas à resistência à insulina (PYKALISTO *et al.*, 1975; NIKKILÄ *et al.*, 1977; TASKINEN *et al.*, 1982). Estes dados estão de acordo com evidências de que a insulina é um dos mais potentes reguladores da lipoproteína lipase (SADUR *et al.*, 1982; FARESE *et al.*, 1991). A insulina estimula a lipoproteína lipase do tecido adiposo por diferentes mecanismos (ONG *et al.*, 1988; SEMENKIVICH *et al.*, 1989) e caso estas ações não aconteçam de forma adequada, o *clearance* das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis acontecerá de forma inadequada. Panarotto *et al.* (2002) demonstraram que a resistência à insulina afeta a expressão da lipoproteína lipase pelo tecido adiposo no período pós-prandial. Este grupo também demonstrou que a lipoproteína lipase é um determinante importante da severidade da hipertrigliceridemia pós-prandial em indivíduos não diabéticos com início de resistência à insulina. Lembrando que a hipertrigliceridemia pode levar à geração de um padrão de lipoproteínas altamente aterogênico (LAASKO *et al.*, 1990; REAVEN *et al.*, 1993), estes dados exemplificam como o tecido adiposo, através de sua produção de lipoproteína lipase na fase pós-prandial, pode ser o fator principal desencadeante da síndrome de resistência à insulina. De fato, recentemente, Koike *et al.* (2004) demonstraram que a superexpressão da lipoproteína lipase em coelhos Watanabe transgênicos, reduziu acentuadamente a hiperlipidemia e a obesidade.

Como em muitos destes estudos a hiperinsulinemia está associada ao aumento também de glicose e/ou lipídeos, McTernan *et al.* (2002) elaboraram um

ensaio, em humanos, onde retiraram tecido adiposo de indivíduos normais, isolaram os adipócitos e realizaram tratamento crônico destas células com insulina. Nestes ensaios o grupo demonstrou que a exposição prolongada (47 h) das células adiposas a altas concentrações de insulina (100 e 1.000 nmol/l), leva a aumento na expressão da lipoproteína lipase e também na lipólise. Como os ratos hiperlipidêmicos, de nosso estudo, apresentam hiperinsulinemia sem apresentarem alterações na resposta anti-lipolítica à insulina, podemos sugerir que o aumento no tamanho dos panículos adiposos das regiões epididimal e perirenal seja devido ao aumento na expressão da lipoproteína lipase destes tecidos adiposos. Estudos de expressão desta enzima devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Em adipócitos de ratos hiperlipidêmicos a lipólise basal apresentou-se significativamente reduzida quando comparada aos ratos normolipidêmicos, porém não houve alteração na resposta máxima induzida pelo dibutiril-AMPC, indicando que as etapas pós-receptor permaneceram intactas. Os hormônios que afetam agudamente a lipólise em adipócitos são as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e a insulina (LARGE & ARNER, 1998). A regulação da lipólise pelas catecolaminas envolve a estimulação da adenilato ciclase pelos subtipos β de adrenoreceptores (β_1 , β_2 e β_3) e a inibição pelo subtipo α_2 -AR (LEIBEL *et al.*, 1989; LONQVIST *et al.*, 1993). Além disto, mediadores parácrinos, tais como a adenosina, apresentam potente ação antilipolítica (CASTAN *et al.*, 1994). A adenosina endogenamente liberada se liga a receptores A1 localizados na membrana plasmática dos adipócitos e inibem a adenilato ciclase, levando a uma inibição tônica da lipólise (HONNOR *et al.*, 1985a,b). A desaminação da adenosina em inosina, pela enzima adenosina deaminase, aumenta a lipólise em adipócitos (HONNOR *et al.*, 1985a).

Em mulheres pós-menopausa, há uma tendência ao ganho de peso, principalmente na região abdominal (HAARBO *et al.*, 1991; LEY *et al.*, 1992), e a magnitude deste aumento de peso na região abdominal está correlacionada à hipertensão, dislipidemias e diabetes tipo 2 (LAPIDUS *et al.*, 1984). Os adipócitos da região abdominal são mais sensíveis e responsivos que os da região glútea à

estimulação β -adrenérgica da lipólise, enquanto que os adipócitos da região glútea apresentam uma maior atividade da lipoproteína lipase que os adipócitos da região abdominal de mulheres mais velhas, sugerindo que ocorrem diferenças regionais no metabolismo dos adipócitos com a idade (REBUFFE-SCRIVE *et al.*, 1987; BERMAN *et al.*, 1998; NICKLAS *et al.*, 2000; FERRARA *et al.*, 2002). Além disto, mulheres em pós-menopausa apresentam diminuição da lipólise basal regional e aumento da atividade da lipoproteína lipase no tecido adiposo do que mulheres em período de peri-menopausa (FERRARA *et al.*, 2002), sugerindo que lipólise basal diminuída associada à alta atividade da lipoproteína lipase do tecido adiposo podem predispor mulheres mais velhas a ganhar peso após a menopausa. Recentemente, Berman *et al.* (2004) demonstraram que as diferenças regionais na lipólise estimulada por β -adrenoceptores, na inibição da lipólise pela adenosina e na atividade da lipoproteína lipase do tecido adiposo, condições metabólicas que predispõe mulheres mais velhas ao acúmulo de gordura na região central, não foram modificadas por tratamentos de redução de peso. Estes autores sugerem que estas alterações não são secundárias à obesidade e sim predisponentes.

A lipólise basal é preferencialmente inibida pela adenosina. A insulina, mesmo sendo uma potente substância anti-lipolítica não afeta a lipólise basal. Morimoto *et al.* (1998), estudando adipócitos isolados de ratos, demonstraram que a insulina inibe somente a lipólise induzida pelos agentes lipolíticos, tais como a noradrenalina e o ACTH, porém não a lipólise basal que acontece na ausência de agentes lipolíticos. Como já mencionado acima, os ratos hiperlipidêmicos apresentaram aumento no peso dos panículos adiposos das regiões epididimal e peri-renal. Os adipócitos isolados da região epididimal apresentaram acentuada redução na lipólise basal. Se esta inibição é decorrente de aumento na produção local de adenosina ou de aumento na expressão de receptores A1 (que inibem a adenilato ciclase) é fato a ser investigado.

Os adipócitos isolados de ratos hiperlipidêmicos apresentaram aumento significativo na sensibilidade à isoprenalina e à adrenalina sem alteração de sensibilidade à noradrenalina, BRL37344, CGP12177A ou salbutamol. A

resposta máxima foi significativamente reduzida à isoprenalina e à noradrenalina, quando comparado aos adipócitos provenientes dos ratos normolipidêmicos. O tratamento com o infuso a 10% não modificou nenhum dos efeitos da dieta sobre a lipólise dos adipócitos isolados, exceto a resposta máxima à adrenalina que não foi modificada neste grupo de animais. Estes resultados, em conjunto, nos permitem concluir que o efeito da dieta sobre a redução da lipólise basal associada ao possível aumento na atividade da lipoproteína lipase no tecido adiposo, nesta região, pelas altas concentrações de insulina circulante, podem estar contribuindo de maneira importante para o aumento do peso no pâncreas adiposo epididimal dos ratos que ingeriram a dieta hiperlipídica, e que, mesmo com aumento na sensibilidade a agonistas não seletivos, isoprenalina e adrenalina, houve importante redução na lipólise basal e nas respostas máximas induzidas pela isoprenalina e noradrenalina, sugerindo que, provavelmente, a adenosina esteja envolvida neste efeito, já que os resultados indicam que mecanismos pós-receptor destes adipócitos não foram alterados.

A administração da dieta hiperlipídica levou ao aumento significativo no peso do tecido hepático. Conforme descrito na introdução desta tese, é clássico o aparecimento de esteatose hepática em se tratando de dieta hiperlipídica. Em nossos experimentos os ratos jovens hiperlipidêmicos apresentaram esteatose hepática já em 4 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica. Este quadro permaneceu inalterado após mais duas semanas de ingestão de dieta com ou sem o tratamento com o infuso a 10%.

Ao final do tratamento com a dieta hiperlipídica os ratos apresentaram aumento significativo nas concentrações séricas de colesterol total, LDL, VLDL, triacilgliceróis e insulina. O tratamento com o infuso a 10% não alterou este perfil sérico. O índice aterogênico, significativamente elevado em ratos hiperlipidêmicos, permaneceu inalterado em ratos hiperlipidêmicos tratados com o infuso a 10%.

A oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), pode ser o início da aterogênese (WALZEM *et al.*, 1995; JIRA *et al.*, 1996; HOLVOET *et al.*, 1998) e está diretamente relacionada com a idade (FRIEDMAN *et al.*, 1997). Aumento nas concentrações de LDL e subsequente aumento nas concentrações de radicais

livres que medeiam os danos causados pelas LDL, representam importante fator de risco (HEISS *et al.*, 1980; STEVENSON *et al.*, 1993), e uma etapa importante na patogenia da aterosclerose (STEINBERG *et al.*, 1989).

A relação entre a oxidação da LDL e a idade é congruente com a teoria dos radicais livres que aumentam com a idade, causando acúmulo de danos celulares a macromoléculas tais como carboidratos, proteínas, lipídios e DNA. Evidências desta hipótese são suportadas pelo aumento no conteúdo de malondialdeído, como medido em ensaio do ácido tiobarbitúrico, que ocorre em cérebro de ratos com a idade e servem como marcadores de aumento do dano oxidativo (JIRA *et al.*, 1996). A oxidação da LDL é um processo de formação de radical livre no qual o ácido graxo poliinsaturado da LDL pode ser degradado através da peroxidação lipídica para uma variedade de aldeídos e outros produtos (ESTERBAUER *et al.*, 1991). O LDL oxidado pode se envolver na formação das células espumosas. O LDL oxidado está modificado na sua composição e estrutura, tanto que pode atuar como um receptor “scavenger” em células endoteliais, macrófagos, e células musculares lisas (YOUNG & McENENY, 2001). Por outro lado, o receptor medeia a captação do LDL nativo, mas a captação do LDL oxidado não é diminuída por aumento nas concentrações de colesterol (FRIEDMAN *et al.*, 1997; YOUNG & McENENY, 2001).

A importância dos radicais livres mediando a oxidação de LDL e levando às doenças cardiovasculares é suportada pelas propriedades preventivas dos anti-oxidantes e de alimentos contendo anti-oxidantes. Estudos demonstraram a eficácia na redução de problemas cardiovasculares com o consumo de frutas, vegetais (JOSHUPURA *et al.*, 1999) e de vitaminas E e A (CHERUBINI *et al.*, 2001; GALE *et al.*, 2001; KLIPSTEIN-GROBUSCH *et al.*, 2001; MEZZETTI *et al.*, 2001). Os efeitos preventivos das vitaminas A, C e E são mais eficazes quando administrados alimentos que as contêm do que quando são oferecidas como suplementos (YOCHUM *et al.*, 2000; SINGHAL *et al.*, 2001).

Baseados nestes dados, Nakamura & Omaye (2004) estudaram a possível relação entre a idade e a oxidação da lipoproteína plasmática. Estes autores isolaram lipoproteína sangüínea de ratos com 2, 7 e 15 meses de idade e

estudaram os efeitos das concentrações séricas de vitaminas E e C sobre a oxidação da lipoproteína plasmática e também a capacidade antioxidante total do soro ou da lipoproteína dos ratos em diferentes idades. Estes autores demonstraram que com a idade ocorre redução significativa na concentração de vitamina C, produzida endogenamente a partir da glicose, através da via do ácido glicurônico (OMAYE *et al.*, 1982), e aumento na susceptibilidade da lipoproteína à oxidação. Os autores sugerem que a aumentada oxidação da lipoproteína em ratos mais velhos pode ser decorrente da quantidade reduzida de LDL reciclada pela vitamina C sérica.

Nossos resultados demonstraram que os efeitos do infuso sobre o perfil sérico dos ratos normo- ou hiperlipidêmicos foi diferente quando estudamos ratos jovens ou adultos. O tratamento com infuso foi eficaz em reduzir a concentração de colesterol total em adultos e em jovens hipercolesterolêmicos, além de evitar o aumento no índice aterogênico observado em ratos hiperlipidêmicos não tratados.

Não foi investigado se o infuso ou a própria DHC apresentam propriedades antioxidantes. Os dados obtidos nesta tese sugerem que seu efeito hipolipidêmico pode ser decorrente desta propriedade. Várias substâncias de origem vegetal apresentam efeito anti-oxidante como por exemplo a ginkgo biloba (YOSHIKAWA *et al.*, 1999), o boldo (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2003) e o alho (LAU, 2001).

Além disto, podemos sugerir que o efeito do infuso depende da integridade do tecido hepático, o que não foi observado em ratos hiperlipidêmicos. Os artigos encontrados na literatura que relatam efeitos positivos do infuso ou DHC em animais hiperlipidêmicos não descrevem as possíveis alterações hepáticas destes tratamentos de indução de hiperlipidemia.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que:

- 1- O tratamento com infuso de sacaca, quando administrado a ratos adultos, foi eficaz em reduzir as concentrações plasmáticas de glicose e de colesterol total. Estes efeitos não foram observados em ratos jovens normolipidêmicos ou hiperlipidêmicos.
- 2- A resposta lipolítica aos agonistas β -adrenérgicos de adipócitos isolados de ratos normolipidêmicos foi modificada pelo tratamento com infuso a 5% em adultos e com infuso a 10% em jovens, apresentando aumento na participação do adrenoceptor β_2 .
- 3- Ratos jovens hiperlipidêmicos apresentaram significativa redução na lipólise basal bem como nas respostas máximas induzidas pela isoprenalina e pela noradrenalina. Houve aumento da sensibilidade aos agonistas isoprenalina e adrenalina. O tratamento destes ratos, com infuso a 10%, impediu apenas a alteração de sensibilidade à adrenalina.
- 4- Após quatro semanas de ingestão da dieta hiperlipídica, ratos jovens apresentaram esteatose hepática. Este quadro não foi alterado quer seja pela administração do infuso ou dieta por mais duas semanas.

Estes resultados permitem concluir que:

- 1- Os efeitos do infuso de *Croton cajucara* variam de acordo com a faixa etária ou peso corporal dos ratos em estudo, e dependem da integridade do tecido hepático.
- 2- A indução de hiperlipidemia pela dieta em ratos também depende da idade dos animais. Em ratos adultos seus efeitos são diferentes dos observados em ratos jovens.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELL, L. L.; BRODIE, B. B.; KENDALL, R. E. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.*, v. 195, p. 357-366, 1952.
- AINSLIE, D. A. *et al.* Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr.*, v. 71, n.2, p. 438-42, 2000.
- ALBA, L. M.; LINDOR, K. Non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol. Ther.* v.17, n.8, p. 977-986, 2003.
- ALONSO, R.; GRANT, G.; MARZO, F. Thermal treatment improves nutritional quality of pea seeds (*Pisum sativum* L.) without reducing their hypocholesterolemic properties. *Nutr Res.*, v. 21, n.7, p. 1067-1077, 2001.
- ARAÚJO, V. C. *et al.* Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. *Acta Amazônica*, p. 45-47, 1971.
- ARNER, P. Adrenergic receptor function in fat cells. *Am. J. Clin. Nutritional.*, v. 55, p. 2285-36S, 1992.
- ARNER, P. Is familial combined hyperlipidaemia a genetic disorder of adipose tissue? *Curr Opin Lipidol.*, v.8, n.2, p. 89-94, 1997.
- ARNER, P. *et al.* Adrenergic regulation of lipolysis *in situ* at rest and during exercise. *J. Clin. Invest.*, v.85, p.893-898, 1990a.
- ARNER, P. *et al.* Beta-adrenergic expression in human fat cells from different regions. *J. Clin. Invest.*, v.86, p.1595-1600, 1990b.

- BAILEY, C. J.; DAY, C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*, v.12, n. 8, p. 553-64, 1989.
- BALKIN, M.S.; SONNENBERG, M. Hormone-induced homologous and heterologous desensitization in the rat adipocyte. *Endocrinology*, v. 109, n. 4, p. 1176-1183, 1981.
- BASSANI, R.A.; DE MORAES, S. Subsensitivity to beta adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock stressed rats. *Gen. Pharmacol.*, v. 18, p. 473-477, 1987.
- BENOVIC, J. L. *et al.* Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. *An. Rev. Cel. Biol.*, v. 4, p. 405-428, 1988.
- BERMAN, D. M. *et al.* Regional differences in adrenoceptor binding and fat cell lipolysis in obese, postmenopausal women. *Metabolism*, v. 47, p. 467-473, 1998.
- BERMAN, D. M. *et al.* Regulation of lipolysis and lipoprotein lipase after weight loss in obese, postmenopausal women. *Obes. Res.*, v. 12, p. 32-39, 2004.
- BHATNAGAR, D. Lipid-lowering drugs in the management of hyperlipidaemia. *Pharmacol Ther.*, v. 79, n. 3, p. 205-30, 1998.
- BIGHETTI, E.J. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. *J. Pharmacy Pharmacol.*, v. 51, n. 12, p. 1447-53, 1999.
- BIHAIN, B. E. *et al.* Lipolysis-stimulated receptor: a newcomer on the lipoprotein research scene. *Diabete Metab.*, v. 21, n. 2, p. 121-126, 1995.

- BJORNTORP, P., KARLSSON, M.; PETERSSON, P. Expansion of adipose tissue storage capacity at different ages in rat. *Metabolism*, v. 31, p. 366-373, 1982.
- BOUSQUET-MÉLOU, A. *et al.* Desensitization of β -adrenergic responses in adipocytes involves receptor subtypes and c AMP phosphodiesterase. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 289, p. 235-247, 1995.
- BOWEN, W.P.; FLINT, D. J.; VERNON, R.C. Regional and interspecific differences in the ligand binding properties of adrenergic receptors of individual white adipose tissue depots in the sheep and rat. *Biochem. Pharmacol.*, v. 44, n. 4, p. 681-686, 1992.
- BREWER, H. B. *et al.* Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma: an overview. *Clin. Chem.* v. 34/8, p. B4-B24, 1988.
- BRITO, A. R. *et al.* Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from *C. cajucara*. *Planta Medica*, v. 64, p. 126-129, 1998.
- BROWN, G. *et al.* Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N. Engl. J. Med.* v. 323, p. 1289-1298, 1990.
- BROWN, M. S.; KOVANEN, P.T.; GOLDSTEIN, J. L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, v. 212, p. 628-634, 1981.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, v. 232, p. 34-47, 1986.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The genetic basis of hypercholesterolemia: clinical and therapeutic implications. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*, v. 49, n. 2, p. 135-137, 1993.

- BÜLLOW, J. Lipid mobilization and utilization. In: Poortmans JR (ed). *Principles of exercise Biochemistry*, 2 ed., *Med Sport Sci*, Karger, Basel, Switzerland, p. 158-185, 1993.
- CAMPOS, A. R. *et al.* Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. *Fitoterapia*, v. 73, p. 116-120, 2002.
- CARLSON, N. R. O comportamento alimentar: comer. In: *Fisiologia do comportamento*. 7 ed. São Paulo: Manole, p. 392-422, 2002.
- CARPENÉ, C.; AMBID, L.; LAFONTAN, M. Predominance of beta 3-adrenergic component in catecholamine activation of lipolysis in garden dormouse adipocytes. *Am. J. Physiol.*, v. 266, p. R896, 1994.
- CARPENÉ, C. *et al.* Desensitization of beta-1 and beta-2, but not beta-3, adrenoceptor-mediated lipolytic responses of adipocytes after long term norepinephrine infusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 265, n. 1, p. 237-247, 1993.
- CARPENÉ, C. *et al.* Selective reduction of alpha 2-adrenergic responsiveness in hamster adipose tissue during prolonged starvation. *Am. J. Physiol.*, v. 259, p. E80-E88, 1990 a.
- CARPENÉ, C. *et al.* Increased alpha 2-adrenergic binding sites and antilipolytic effect in adipocytes from genetically obese rats. *J. Lipid Res.*, v.31, p.811-819, 1990b.

- CARVALHO, J. C. T. *et al.* Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *trans*-dehidrocrotinin, a 19-nor-clerodane diterpene from *C. cajucara*. Part 1. *Planta Medica.*, v. 62, p. 402-404, 1996.
- CASTAN, I. Antilipolytic effects of α_2 -adrenergic agonists, neuropeptide Y, adenosine, and PGE_1 in mammal adipocytes. *Am. J. Physiol.*, v. 266, p. R1141-1147, 1994.
- CASTELLI, W. P.; LEVITAS, I. M. *Current Prescribing*, v. 6177, p. 39, 1977.
- CHERUBINI, A. *et al.* High vitamin E plasma level and low-density lipoprotein oxidation are associated with the absence of atherosclerosis in octogenarians. *J. Am. Geriatr. Soc.*, v. 49, p. 651-654, 2001.
- CHOI, J. S. *et al.* Hypolipemic and hypoglycemic activities of *Prunus davidiana* in high fat-fed rats. *Arch Pharm Res*, v. 14, p. 44-47, 1991.
- DI-STASI, L. C. *et al.* Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoter.*, v. LXV 6, p. 529-40, 1994.
- DI-STASI, L. C. *et al.* *Plantas Medicinais da Amazônia*, Ed. UNESP, São Paulo, p. 127-128, 1989.
- DOLE, V.P.; MEINERTZ, H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.*, v. 235, p. 2595, 1960.
- ECKEL, R. H. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med.* v. 320, p. 1060-1068, 1989.
- ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res.*, v. 33, n. 11, p. 1569-1582, 1992.

- ESTERBAUER, H. *et al.* Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 53, p. 314S-321S, 1991.
- FARESE, R. V. Jr; YOST, T. J.; ECKEL, R. H. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism*. v. 40, n.2, p. 214-6, 1991.
- FARIAS, R.A.F. *et al.* Effects of *Croton cajucara* Benth extract on serum lipids of rats fed a high fat diet. *Phytotherapy Res.*, v.10, p.697-699, 1996.
- FARIAS, R. A. F. *et al.* Hypoglycemic effect of *trans*-dehydrocrotonin, a *nor*-clerodane diterpene from *C. cajucara*. *Planta Med.*, v.66, p.558-560, 1997.
- FARIAS-SILVA, E. *et al.* Stress-induced alteration in the lipolytic response to beta-adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *J Lipid Res.*, v. 40, n.9, p. 1719-1727, 1999.
- FARIAS SILVA, E. *et al.* Glucocorticoid receptor and beta-adrenoceptor expression in epididymal adipose tissue from stressed rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003.
- FERRARA, C. M. *et al.* Differences in adipose tissue metabolism between postmenopausal and perimenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 87, p. 4166-4170, 2002.
- FIELDING, C. J.; FIELDING, P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.*, v. 36, n. 2, p. 211-228, 1995.
- FORTE, T. M. *et al.* Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles. *J Lipid Res.*, v. 34, n. 2, p. 317-324, 1993.

- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.*, v. 28, n.10, p. 2077-2080, 1982.
- FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.*, v. 18, p. 499-502, 1972.
- FRIEDMAN, G. *et al.* Scavenger receptor activity and expression of apolipoprotein E mRNA in monocyte-derived macrophages of young and old healthy men. *Atherosclerosis*, 128, 67-73, 1997.
- FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.*, v. 395, p. 763-70, 1998.
- FRIEDMAN, M. I. *et al.* Food intake in diabetic rats: isolation of primary metabolic effects of fat feeding. *Am J. Physiol.*, v. 249, p. R44-R51, 1985.
- FU, M. X. *et al.* The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl) lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem.*, v. 271, n. 17, p. 9982-9986, 1996.
- GALE, C. R. *et al.* Antioxidant vitamin status and carotid atherosclerosis in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 74, p. 402-408, 2001.
- GALITZKY, J. *et al.* New tools for human fat cell alpha2A-adrenoceptor characterization. Identification on membranes and on intact cells using the new antagonist [3H] RX821002. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 262, p. 312, 1990.

- GALITZKY, J. *et al.* P. Role of vascular α_2 adrenoceptors in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, v. 91, p. 1997-2003, 1993a.
- GALITZKY, J. *et al.* Beta 3- adrenoceptors in dog adipose tissue: cellular studies on their involvement in the lipomobilizing effects of catecholamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 266, p. 358-366, 1993b.
- GARRETT, R.H.; C.M. GRISHAM. Metabolism and its regulation. Saunders College Publishing, International Edition, In: *Biochemistry*, part III: p. 543-898, 1995.
- GERMACK, R. *et al.* Beta-adrenoceptor subtype expression and function in rat white adipocytes. *Br. J. Pharmacol.*, v. 120, n.2, p. 201-210, 1997.
- GINSBERG, H. N. Lipoprotein physiology and its relationship to atherogenesis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, v. 19, p. 211-228, 1990.
- GOLDBERG, R. *et al.* Diabetic response to pravastatin during the care study. *Circulation*, v. 94 (suppl I), p. I-540, 1996.
- GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, v. 343, p. 425-430, 1990.
- GORDON, T. *et al.* High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.*, 62 (5): 707-714, 1977.
- GOTTO, A. M. Jr.; JONES, P. H.; SCOTT, L. W. The diagnosis and management of hyperlipidemia. *Dis Mon.*, v. 32, n.5, p. 245-311, 1986.

- GRANNEMAN, J.G. Effect of agonist exposure on the coupling of beta1 and beta3 adrenergic receptors to adenylyl cyclase in isolated adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 261, n. 2, p. 638-642, 1992b.
- GRANNEMAN, J. G.; LAHNERS, K. N.; CHAUDRY, A. Molecular cloning and expression of the rat beta3-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.*, v. 40, p. 895-899, 1991.
- GRANNEMAN, J.G.; LAHNERS, K.N. Differential adrenergic regulation of beta1 and beta3 adrenoceptor messenger ribonucleic acid in adipose tissues. *Endocrinology*, v. 130, p. 109-114, 1992a.
- GRASSI-KASSISSE, *et al.* Efeitos do tratamento crônico com infuso de Sacaca sobre a glicemia e estoques de glicogênio em ratos. XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG-Brasil, 1998.
- GREENBERG, D.; SMITH, G. P.; GIBBS, J. Intraduodenal infusions of fats elicit satiety in sham-feeding rats. *Am. J. Physiol.*, v. 259 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 28), p. R110-118, 1990.
- GRYNBERG, N. F. *et al.* Antitumor activity of two 19-nor-clerodano diterpenes, trans-dehydrocrotonin and transcrotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Médica*, v. 65, p. 687-699, 1999.
- GUIDICELLY, Y.; AGLI, B.; LACASA, D. Beta adrenergic receptor desensitization in rat adipocyte membranes. *Bioch. Biophys. Acta*, v. 585, p. 85-93, 1979.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Insulin, glucagon, and diabetes mellitus. In: *Textbook of Medical Physiology*. 9 ed. Philadelphia: WB Saunders Company, p. 971-982, 1996.

- HAARBO, J. *et al.* Post-menopausal hormonal replacement therapy prevents central distribution of body after menopause. *Metabolism.*, v. 40, p. 1323-1326, 1991.
- HAGIWARA, H.; INONE, K.; UDA, H. A total synthesis of an antibacterial clerodane, 16-hydroxycleroda-3, 13 (14) Z- dien- 15, 16- olide. *J. Chem. Soc. Perkins Trans.*, v. 1, p. 757-764, 1995.
- HALFORD, J. C.; BLUNDELL, J. E. Pharmacology of appetite suppression. *Progr. Drug. Res.*, v. 54, p. 25-28, 2000.
- HALUZÍK, M. D. *et al.* Serum leptin levels in patients with hyperlipidemias. *Nutrition*, v. 16, p. 429-433, 2000.
- HARDIE, L. J. *et al.* Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 223, n.3, p. 660-665, 1996.
- HAVEL, R. J. The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res*, v. 25, n. 13, p. 1570-1576, 1984.
- HAVEL, R. J.; EDER, H.A.; BRAGDON, J. H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.*, v. 34, n.9, p. 1345-53, 1955.
- HAVEL, R. J.; KANE, J. P. Quantification of triglyceride transport in blood plasma: a critical analysis. *Fed Proc.*, v. 34, n. 13 p. 2250-2257, 1975.

- HAVEL, R.J.; KANE, J.P. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed. (Scriver, C.R., Beudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D., eds) McGraw-Hill, New York, p. 1841-1851, 1995.
- HEISS, G. *et al.* Lipoprotein-cholesterol distributions in selected Northern American populations. *Circulation*, v. 61, p. 302-314, 1980.
- HENRY, R.J.; CANNON, D. C. WINKELMAN, J. In: *Clinical Chemistry Principles and Techniques*, 2 ed. Harper and Row Publishers Inc NY. p. 1288, 1974.
- HOLVOET, P. *et al.* Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary síndromes and stable coronary artery disease. *Circulation*, v. 98, p. 1487-1494, 1998.
- HOLLENGA, C.H.; ZAAGSMA, J. Direct evidence for the atypical nature of functional beta-adrenoceptors in rat adipocytes. *Br. J. Pharmacol.*, v. 98, p.1420-1424, 1989.
- HONNOR, R. C.; DHILLON, G. S.; LONDOS, C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes: I. Cell preparation, manipulation, and predictability in behavior. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p. 15122-15129, 1985a.
- HONNOR, R. C.; DHILLON, G. S.; LONDOS, C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes: II. Definition of steady-state relationship with lipolytic and antilipolytic modulators. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p. 15130-15138, 1985b.
- ICHIHARA, Y. *et al.* Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, v. 58, n. 6, p. 549-551, 1992.

- ITOKAWA, H. *et al.* Norclerodane Diterpenes from *Croton cajucara*. *Phytochem.*, v. 28, n. 6, p. 1667-1669, 1989.
- JIRA, W.; SPITELLER, G.; SCHRAMM, A. Increase in hydroxy fatty acids in human low density lipoproteins with age. *Chem. Phys. Lipids.*, v. 84, n. 2, p. 165-173, 1996.
- JOSHIPURA, K. J. *et al.* Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA*, v. 282, n. 13, p. 1233-1239, 1999.
- KITAZAWA, E. *et al.* Novel diterpenelactones with anti-peptic ulcer activity from *Croton sublyratus*. *Chem. Pharm. Bull.* v. 28, p. 227-234, 1980.
- KITAZAWA, E. *et al.* Plaunol A and B, new anti-ulcer diterpene lactones from *Croton sublyratus*. *Tetrahedron Letts.*, v. 13, p. 1117-1120, 1979.
- KLIPSTEIN-GROBUSCH, K. *et al.* Dietary anti-oxidants and peripheral arterial disease. *Am. J. Epidemiology.*, v. 154, n. 2, p. 145-149, 2001.
- KOIKE, T. *et al.* Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits improves hyperlipidemia and obesity. *J. Biol. Chem.*, v. 279, n. 9, p. 7521-9, 2004.
- KOTEISH, A.; DIEHL, A. M. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis.*, v. 21, n.1, p. 89-104, 2001.
- KUBO, I., ASAKA, Y.; SHIBATA, K. Insect growth inhibitory nor-diterpenes, cis-dehydrocrotonin and trans-dehydrocrotonin, from *Croton cajucara*. *Phytochem.*, v. 30 n.8, p. 2545-2546, 1991.

- LAAKSO, M.; SARLUND, H.; MYKKÄNEN, L. Insulin resistance is associated with lipid and lipoprotein abnormalities in subjects with varying degrees of glucose tolerance. *Arteriosclerosis*, v. 10, n. 2, p. 223-31, 1990.
- LAFONTAN, M. *et al.* Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *Human Reprod.*, v. 12, , p. 6-20, 1997.
- LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.*, v. 34, p. 1057-1091, 1993.
- LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev.*, v. 16, n.6, p. 716-738, 1995.
- LANGIN, D., HOLM, C. & LAFONTAN, M. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 55, p. 93-109, 1996.
- LANGIN, D. *et al.* Coexistence of three beta-adrenergic receptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 199, p. 291-301, 1991.
- LAPIDUS, L. *et al.* Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br. Med. J.*, v. 289, p. 1257-1261, 1984.
- LARGE, V.; ARNER, P. Regulation of lipolysis in humans: pathophysiological modulation in obesity, diabetes and hyperlipidaemia. *Diabetes metab.*, v. 24, p.409-418, 1998.
- LAU, B. H. S. Suppression of LDL oxidation by garlic. *J. Nutr.*, v. 131, p. 985S-988S, 2001.

- LEE, R. J. Fatty change and steatohepatitis. In: Lee, RJ (ed): Diagnostic Liver Pathology, St Louis, Mosby – Year Book, p. 167-194, 1994.
- LEIBEL, R. L.; EDENS, N. K.; FRIED, S. K. Physiological basis for the control of body fat distribution in humans. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 9, p. 417-443, 1989.
- LEY, C. J.; LEES, B.; STEVENSON, J. C. Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 55, p. 950-954, 1992.
- LÖNNQVIST, F.; ARNER, P. Interactions between adenylate cyclase inhibitors and beta-adrenoceptors in isolated human fat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.161, p. 654-660, 1989.
- LONNQVIST, F. *et al.* Evidence for a functional β_3 -adrenoceptor in man. *Br. J. Pharmacol.*, v. 110, p.929-936, 1993.
- MACIEL, M. A. M. C. *cajucara*: uma escolha etnobotânica, In: Tese: Doutor em química, IQ, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil, p.150, 1997.
- MACIEL, M. A. M. *et al.* Terpenoids from *C. cajucara*, *Phytochemistry*, v. 49, p. 823-828, 1998a.
- MACIEL, M. A. M. *et al.* Estudo da variação dos teores de terpenóides bioativos isolados de *C. cajucara*, nativos e cultivados no estado do Pará. *Rev. Univer. Rural Série Ciências Exatas Terra*. v. 18/20, p.17-34, 1998b.
- MACIEL, M. A. M. *et al.* Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *J. Ethnopharm.*, v.70, p.41-55, 2000.

- MAFFEI, M. *et al.* Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.*, v. 1, n. 11, p. 1155-61, 1995.
- MAHLEY, R. W. *et al.* Disorders of lipids metabolism. In: Williams Textbook of Endocrinology. Wilson JD; Foster, DW; Kronenberg, HM; Larsen, PR, Editors. WB Saunders Co. Philadelphia p. 1099 – 1153, 1998.
- MAHLEY, R. W.; HUANG, Y.; RALL, S.C. Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res.*, v. 40, n. 11, p. 1933-1949, 1999.
- MARCONDES, F.K. *et al.* Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 74, p. 663-669, 1996.
- MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, v. 2, p. 137-189, 1995.
- MARTINS, J. E. C. *Plantas medicinais de uso na Amazônia*, In: Centros de Estudos Jurídicos do Pará. Belém, Brazil, p 92, 1989.
- MAURIÈGE, P. *et al.* Heterogeneous distribution of beta and α_2 -adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 17, p. 156-165, 1987.
- McCHESNEY, J. D.; CLARK, A. M. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. *J. Nat. Prod.*, v. 54, p. 1625-1633, 1991.

- McGOWAN, M. W. *et al.* A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem.*, v. 29, n.3, p. 538-42, 1983.
- McTERNAN, P. G. *et al.* Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue *in vitro*. *Diabetes*, v. 51, p. 1493-1498, 2002.
- MEZZETI, A. *et al.* Vitamin E and lipid peroxide plasma levels predict the risk of cardiovascular events in a group of healthy very old people. *J. Am. Geriatrics Society.*, v. 49, p. 533-537, 2001.
- MORIMOTO, C.; TSUJITA, T.; OKUDA, H. Antilipolytic actions of insulin on basal and hormone-induced lipolysis in rat adipocytes. *J. Lipid. Res.*, v.38, p. 957-962, 1998.
- MORTIMER, B. C. *et al.* Intracellular localization and metabolism of chylomicron remnants in the livers of low density lipoprotein receptor-deficient mice and apoE- deficient mice. Evidence for slow metabolism via an alternative apoE-dependent pathway. *J Biol Chem.*, v. 270, n. 48, p. 28767-76, 1995.
- MÜLLER, A. H.; OSTER, C. B.; LUNA, M. S. Terpenóides de *C. cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). 38^a. Reunião Anual da SBPC. São Paulo, SP, Brazil, p. 631, 1986.
- NAKAMURA, Y. K.; OMAIE, S. T. Age-related changes of serum lipoprotein oxidation in rats. *Life Sciences*, v. 74, p. 1265-1275, 2004.
- NICKLAS, B. J. *et al.* Responses of adipose tissue lipoprotein lipase to weight loss affect lipid levels and weight regain in women. *Am. J. Physiol.*, v. 279, E 1012-1019, 2000.

- NIEMEIER A. *et al.* VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants *in vitro*. *J Lipid Res.*, v. 37, n. 8, p. 1733-42, 1996.
- NIKKILA, E. A.; HUTTUNEN, J. K.; EHNHOLM, C. Postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in diabetes mellitus. Relationship to plasma triglyceride metabolism. *Diabetes.*, v. 26, p. 11-21, 1977.
- NOURANI, F.R.R.; SPADARI, R.C.; DE MORAES, S. Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: effects of the compounds RU-38486 and RU-28362, *Gen Pharmacol.*, v. 23, n. 4, p. 787-791, 1992.
- NOVIN, F.; SANDERSON, J. D.; GONZALEZ, M. Feeding after nutrient infusion: effect of hypothalamic lesion and vagotomy. *Physiol. Behav.*, v. 22, p. 107-113, 1979.
- OLIVECRONA, T. *et al.* Lipoprotein lipase: site of synthesis and sites of action. *Atheroscl. Rev.*, v. 22, p. 21-25, 1991.
- OLIVEIRA, M.C. *et al.* Efeito da sacaca- *Croton cajucara* Benth. sobre os níveis plasmáticos de lipídios em coelhos hipercolesterolêmicos, X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, (FESBE) livro de resumos, p 224., 1995.
- OMAYE, S. T.; TILLOTSON, J.; SAUBERLICH, H. E. Metabolism of L-ascorbic acid in the monkey. In: Seib, P. A.; Tolbert, B. M. (Eds.), *Advances in Chemistry Series ACS*, Washington, DC, p. 199-221, 1982.

- ONG, J. M. *et al.* Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 263, n. 26, p. 12933-12938, 1988.
- ORDOVAS, J. M.; SCHAEFER, E. J. Genes, variation of cholesterol and fat intake and serum lipids. *Curr Opin Lipidol*, v. 10, p. 15-22, 1999.
- ÖSTMAN, J. Lipolysis and glucose metabolism in adipose tissue in normal and diabetic man, In: Belfiore F., Molinatti, G.M., Reaven G.M. (eds) *Tissue-Specific Metabolic Alterations in Diabetes-Front Diabetes*, Karger, Basel, pp 18-26, 1990.
- PANAROTTO, D. *et al.* Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 32, n. 2, p. 84-92, 2002.
- PATTEN, R. L. The reciprocal regulation of lipoprotein lipase activity and hormone-sensitive lipase activity in rat adipocytes. *J Biol Chem.*, v. 245, n. 21, p. 5577-84, 1970.
- PELLEYMOUNTER, M. A. *et al.* Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, v. 269, p. 540-543, 1995.
- PERAZZO, F. F. *et al.* Anti-inflammatory and antinoceptive activities of terpenoids from *C. cajucara* Benth. In: *II World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare*. ICMAP-ISHS-SAIPA, Mendonza, República Argentina, p. 378, 1997b.
- PRIZKOVÁ, J. Body composition and lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 32, p. 181-186, 1973.

- PYKALISTO, O. J.; SMITH, P. H.; BRUNZELL, J. D. Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase. Effect of diabetes and obesity on basal- and diet-induced activity. *J Clin Invest*, v. 56, n. 5, p. 1108-17, 1975.
- QUINTÃO, E. C. R. Is reverse cholesterol transport a misnomer for suggesting its role in prevention of atheroma formation? *Atherosclerosis*, v. 116, p. 1-14, 1995.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. The endocrine pancreas and the control of blood glucose. In: *Pharmacology*. 3 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 403-416, 1995.
- REAVEN, G. M. *et al.* Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense low density lipoprotein particles. *J. Clin. Invest.*, v. 92, p. 141-6, 1993.
- REBUFFE-SCRIVE, M. *et al.* Regional adipose tissue metabolism in men and postmenopausal women. *Int. J. Obes.*, v. 11, p. 347-355, 1987.
- REIDELBERGER, R. D. *et al.* Postgastric satiety in the sham-feeding rat. *Am. J. Physiol.* v. 244 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 13), R872-R881, 1983.
- RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.*, v. 239, n. 2, p. 375-380, 1964.
- RODRIGUES, M. L.; MARCONDES, F. K.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level, and estrous cycle in rats. *Can J Physiol Pharmacol.*, v. 73, n. 5, p. 602-7, 1995.
- ROHEIM, P. S.; ASZTALOS, B. F. Clinical significance of lipoprotein size and risk for coronary atherosclerosis. *Clin Chem.*, v. 41, p. 147-152, 1995.

- ROMSOS, D.R.; LEVEILLE, G.A.: Effect of diet on activity of enzymes involved in fatty acid and cholesterol synthesis. *Adv. Lipid Res.*, v.12, p. 97-102, 1974.
- SADUR, C. N.; ECKEL, R. H. Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic *clamp* technique. *J. Clin. Invest.*, v. 69, n. 5, p. 1119-25, 1982.
- SCOTT, A. M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*, v. 21, p. 470-475, 1981.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. *et al.* Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Rad. Res.*, v. 37, n. 4, p. 447-452, 2003.
- SCHWARTZ, M. W. *et al.* Central nervous system control of food intake. *Nature*, v. 404, p. 661-671, 2000.
- SEMENKOVICH, C. F. *et al.* Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 15, p. 9030-8, 1989.
- SIDDIQUI, H. L.; MUNESADA, K.; SUGA, T. A biologically active clerodane-type diterpene alcohol and its glycosides from the root-stalks of ferns. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, p. 781-785, 1992.
- SILVA, R. M. *et al.* The lipid-lowering effect of *trans*-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara Benth* in mice fed on high-fat diet. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 53, p. 535-39, 2001a.

- SILVA, R. M. *et al.* Effect of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (Tyloxapol) in mice. *Planta Médica*, v. 67, n. 8, p. 763-765, 2001b.
- SIMÕES, J. C. *et al.* Desidrocrotonina, um norditerpeno de *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). *Cienc. Cult.*, v. 31, p. 1140-1141, 1979.
- SINGHAL, S.; GUPTA, R.; GOYLE, A. Comparison of antioxidant efficacy of vitamin E, vitamin C, vitamin A and fruits in coronary heart disease: a controlled trial. *Journal of Association of Physicians India*, v. 49, p. 327-331, 2001.
- SPADARI, R.C.; DE MORAES, S. Repeated swimming stress and responsiveness of isolated rat pacemaker to chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. *Gen Pharmacol.*, v. 19, n. 4, p. 553-557, 1988.
- STEINBERG, D.: Hormonal control of lipolysis in adipose tissue. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 26, p. 77-86, 1972.
- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E. Beyond cholesterol: modification of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *New England Journal of Medicine*, v. 320, p. 915-924, 1989.
- STEVENSON, J. C.; CROOK, D.; GODSLAND, A. F. Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. *Atherosclerosis*, v. 98, p. 83-90, 1993.

- TACIKOWSKI, T. *et al.* Comparative analysis of lipid profiles assessed by ultracentrifugation in patients with various hyperlipoproteinaemia types in correlation with hepatic steatosis. *Med Sci Monit.*, v. 8, n. 10, p. CR697-701, 2002.
- TAOUI, M. *et al.* Characterization of dog fat cell adrenoceptors: variations in alpha-2 and beta adrenergic receptors distribution according to the extent of the fat deposits and the anatomical location. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 242, n. 3, p. 1041-1049, 1987.
- TAOUI, M. *et al.* Obesity modifies the adrenergic status of dog adipose tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 250, n. 3, p. 1061-1066, 1989.
- TASKINEN, M. R. Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity. *Diabetologia*, v. 22, p. 46-50, 1982.
- TASKINEN, M.R. *et al.* Plasma lipoproteins, lipolytic enzymes, and very low density lipoprotein triglyceride turnover in Cushing syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v. 57, p. 619-626, 1983.
- TASKINEN, M-R. Lipoprotein lipase in hypertriglyceridemias. In: *Borensztajn J.* editor. *Lipoprotein Lipase*. Chicago: Evener Publisher; p. 201-228, 1987.
- TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol.*, v. 22, n.2, p. 158-161, 1969.
- TSIGOS, C., R. J. YONG, A. WHITE, Diabetic neuropathy is associated with increased activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Cli. Endocrinol. Metab.* v. 76, p. 554-559, 1993.

- VALET, P. *et al.* Differential regulation of fat cell beta2 and beta1 adrenoceptors by endogenous norepinephrine in dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 249, p. 271-277, 1989.
- VAN DEN BERG, M.E. Plantas medicinais na Amazônia – Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Gráfica editora Falangola, Belém, Brazil, p. 158-159, 1982.
- VAN DEN BERG, M.E., *Plantas Medicinais na Amazônia – Contribuição ao seu conhecimento sistemático*, 2ª edição, Museu Paraense Emílio Goeldi, CNPq-MCT (Coleção Adolpho Ducke), Belém, Brazil, p. 124-125 e p 168, 1993.
- VANDERLEY, L.C.M. *et al.* Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to footshock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 74, n. 6, p. 670-678, 1996.
- WAHLEFELD, A.W.; BERGMAYER, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd English ed. New York, NY: *Academic Press Inc.*, p. 1831, 1974.
- WALZEM, R. L. *et al.* Older plasma lipoproteins are more susceptible to oxidation: a linking mechanism for the lipid and oxidation theories of atherosclerotic cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 92, n. 16, p. 7460-4, 1995.
- WANG, H. X; NG, T. B. Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sci.*, v. 65, p. 2663-2677, 1999.
- WEILAND, O. Eine enzymatische Methode zur bestimmung von glycerin. *Biochem. Z.*, v. 239, p. 313-316, 1957.

- WINDLER E.; CHAO, Y.; HAVEL, R. J. Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rat. *J Biol Chem.*, v. 255, n. 11, p. 5475-80, 1980.
- WITZTUM, J.L. Drugs used in the treatment of hyperlipoproteinemias, Chapter 36, In: Goodman and Gilman The pharmacological basis of therapeutics, ninth edition, Eds Peery B. Molinoff and Raymond W. Ruddon, p. 875-898, 1996.
- YOCHUM, L. A.; FOLSOM, A. R.; KUSHI, L. H. Intake of antioxidant vitamins and risk of death from stroke in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nut.*, v. 72, p. 476-483, 2000.
- YOSHIKAWA, M. *et al.* Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), v. 46, p. 113-9, 1998.
- YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y. KONDO, M. *Ginkgo biloba* leaf extract: review of biological actions and clinical applications. *Antioxid. Redox. Signal.*, p. 469-480, 1999.
- YOUNG, I. S.; McENENY, J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, v. 29, n. 2, p. 358-362, 2001.